

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUÉLEN CAROLINE FRANTZ

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES DE *Coprinus comatus* EM
CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO SUBPRODUTOS DE MOAGEM DO
TRIGO: OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO**

CURITIBA

2018

SUÉLEN CAROLINE FRANTZ

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES DE *Coprinus comatus* EM
CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO SUBPRODUTOS DE MOAGEM DO
TRIGO: OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Michele Rigon Spier

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

F836o

Frantz, Suélen Caroline

Otimização da produção de amilases de *Coprinus Comatus* em cultivo submerso utilizando subprodutos de moagem do trigo: obtenção dos parâmetros cinéticos do bioprocesso / Suélen Caroline Frantz. – Curitiba, 2018.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.

Orientador: Michele Rigon Spier .

1. Amilases. 2. *Coprinus*. 3. Macromicetos. 4. Glucoamilase. I. Universidade Federal do Paraná. II. Spier, Michele Rigon. III. Título.

CDD: 664.722

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SUELEN CAROLINE FRANTZ** intitulada: **Otimização de produção de amilases de *Coprinus comatus* em cultivo submerso utilizando subprodutos de moagem do trigo: obtenção dos parâmetros cinéticos do bioprocesso.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Agosto de 2018.


MICHELE RIGÓN SPIER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


CRISTINE RODRIGUES
Avaliador Externo (UFPR)


ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Avaliador Interno (UFPR)

*Dedico àqueles que não mediram
esforços para que eu chegasse onde estou e me
tornasse quem sou. Aos meus pais: Elaide e
Aloisio.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por se manter presente em minha vida e me permitir enfrentar cada um dos obstáculos encontrados.

Aos meus pais Elaide e Aloisio, por me ensinarem a me manter firme e humilde em cada dificuldade e por não medirem esforços para me ver conquistar cada um dos meus sonhos. Aos meus irmãos, Daiane e Evandro, ao meu sobrinho e afilhado Mateus, e ao meu cunhado Luciano. Família: vocês sempre foram meu espelho e meu alicerce.

À Professora Dra. Michele pela orientação, exemplo e por todo conhecimento transmitido.

Às Professoras Dr.(as) Cristine e Rosemary, por aceitarem participar da banca, avaliar e contribuir com o trabalho.

Aos diversos laboratórios e funcionários envolvidos na realização deste trabalho, em especial ao Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (LENGBIO), sede da realização dos experimentos. Ao Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), em nome da Profa. Nádia Krieger, por permitir a utilização de equipamento para incubação adequada dos cultivos. Ao Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos (LBC) da Unicentro, pela doação das cepas de cogumelos utilizadas neste e em outros trabalhos. Aos demais laboratórios envolvidos: Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT), Central Analítica, Laboratório de Oxidações Biológicas, Laboratório de Emulsões (EMULTEC) e Laboratório de Catálise e Processos Químicos (LCPQ).

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro e apoio concedido.

Às minhas companheiras de laboratório: Cristina, Franciele, Luana e Tatiane, que se tornaram grandes amigas, e foram fundamentais em cada etapa da realização deste trabalho. Obrigada pela companhia e ajuda na execução dos experimentos, pelo apoio e pelas dicas na escrita e apresentação, pelas injeções de ânimo e pelos momentos de descontração.

Aos amigos que mesmo à distância se fizeram presentes: Ricardo, Joane, Mariana, obrigada pelo apoio.

Aos diversos estagiários e alunos de iniciação científica pelo auxílio nos experimentos e rotinas de laboratório

Aos demais colegas e amigos que tive oportunidade de conhecer em Curitiba e no PPGEAL, pela troca de experiências e momento de descontração.

Aos demais professores do PPGEAL, técnicos, secretários e servidores da UFPR, que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*“Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando à beira-mar, divertindo-me
em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma
concha mais bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua misterioso
diante de meus olhos. ”*

Isaac Newton

RESUMO

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido e são obtidas industrialmente de fontes microbianas. Os custos de meios de cultivo e do processo para produção de enzimas, no entanto, podem ser elevados e inviabilizar a sua utilização. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de subprodutos de moagem do trigo para produção de amilases de uma cepa de macromiceto, *Coprinus comatus*, por cultivo submerso. Os melhores resultados de atividade enzimática (6,07 U.mL⁻¹ para α -amilase e 0,64 U.mL⁻¹ para glucoamilases) foram obtidos em meio contendo 10 g.L⁻¹ de farinha de fundo de moinho (FFM). A FFM foi selecionada como substrato para etapas posteriores, em que foram avaliadas a influência da suplementação e do pH inicial do meio de cultivo na produção das amilases. A composição do meio de cultivo foi otimizada utilizando-se um Planejamento Fatorial Fracionado e um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O Planejamento Fatorial Fracionado selecionou como variáveis significativas a concentração de FFM, ureia e K₂HPO₄, que foram otimizadas por meio do DCCR. As atividades enzimáticas obtidas no meio ótimo (composto de 105 g.L⁻¹ de FFM, 3,761 g.L⁻¹ de ureia e 7,522 g.L⁻¹ de K₂HPO₄) foram de 59,40±0,56 U.mL⁻¹ e 12,65±0,09 U.mL⁻¹ para α -amilases e glucoamilases, respectivamente, o que representa um aumento de 878% e 1877% da produção enzimática inicial. Durante o estudo cinético do bioprocessamento, as atividades enzimáticas obtidas foram ainda superiores aos da etapa de otimização, em tempos mais prolongados de cultivo, chegando a de 62,7 U.mL⁻¹ em 144h para α -amilase e 15,20 U.mL⁻¹ em 204h para glucoamilase. A velocidade específica de crescimento de *C. comatus* no meio de cultivo otimizado ($\mu_{\text{máx}}$) foi de 0,018 h⁻¹ e tempo de duplicação (td) de 38,61h. A utilização do meio FFM propicia produtividade horária máxima ($\gamma_{\text{pmáx}}$) para α -amilase de 0,59 U.mL⁻¹.h⁻¹ e para glucoamilase de 0,11 U.mL⁻¹.h⁻¹. Os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{\text{P/S}}$) obtidos foram de 814,28 U.gds⁻¹ para α -amilase e 231,24 U.gds⁻¹ para glucoamilase, superiores aos resultados obtidos em estudos anteriores utilizando meio sintético. Isto indica que a utilização do meio FFM desenvolvido no presente trabalho representa uma alternativa de baixo custo para a produção de amilases pela espécie estudada. Por fim, a caracterização das enzimas parcialmente purificadas revelou um perfil semelhante ao de diversas amilases de origem fúngica (temperatura ótima de atuação de 50°C e pH 5,0), além da independência do íon cálcio, o que possibilita aplicação em diversos processos industriais.

Palavras-chave: Macromicetos. α -amilases. Glucoamilase. Resíduos. Otimização.

ABSTRACT

Amylases are enzymes that catalyze the hydrolysis of starch and are obtained industrially from microbial sources. The costs of culture media and the process for producing enzymes, however, can be high and make their use unfeasible. In this context, the present study aimed to evaluate the potential of using wheat milling by-products to produce amylases from a macromycete strain, *Coprinus comatus*, under submerged culture. The best results of enzymatic activity (6.07 U.mL^{-1} for α -amylase and 0.64 U.mL^{-1} for glucoamylases) were obtained in medium containing 10 g.L^{-1} of Low-Grade Flour (LGF). LGF was selected as substrate for sequential steps of amylases production, in which the influence of supplementation and the initial pH of the culture medium on the production of amylases were evaluated. The composition of the culture medium was optimized using a Fractional Factorial Design and a Central Composite Rotatable Design (CCRD). The Fractional Factorial Design selected as significant variables the concentration of LGF, urea and K_2HPO_4 , which were optimized by means of CCRD. The enzymatic activities obtained in the optimum medium (composed of 105 g.L^{-1} of FFM, $3,761 \text{ g.L}^{-1}$ of urea and $7,522 \text{ g.L}^{-1}$ of K_2HPO_4) were $59.40 \pm 0.56 \text{ U.mL}^{-1}$ and $12.65 \pm 0.09 \text{ U.mL}^{-1}$ for α -amylases and glucoamylases, respectively, representing an increase of 878% and 1877% of the initial enzyme production. During the kinetic study of the bioprocess, the enzymatic activities obtained were even higher than those obtained on the optimization step, in longer cultivation times, reaching 62.7 U.mL^{-1} in 144h for α -amylase and 15.20 U.mL^{-1} in 204h for glucoamylase. The specific growth rate of *C. comatus* in the optimized culture medium (μ_{max}) was 0.018 h^{-1} and the duplication time (td) was 38.61 h. The use of the LGF medium provides a maximum hourly productivity ($\gamma_{\text{pmáx}}$) for α -amylase of $0.59 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ and for glucoamylase of $0.11 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$. The product formation yield on substrate consumed ($Y_{\text{p/s}}$) obtained were $814.28 \text{ U.gds}^{-1}$ for α -amylase and $231.24 \text{ U.gds}^{-1}$ for glucoamylase, higher than the results obtained in previous studies using synthetic medium. This indicates that the use of the LGF medium developed in the present study represents a low cost alternative for the production of amylases by the species studied. Finally, the characterization of the partially purified enzymes revealed a profile similar to that of several amylases of fungal origin (optimum temperature of 50°C and pH 5.0), besides the independence of the calcium ion, which allows application in several industrial processes.

Keywords: Macromycetes. α -amylase. Glucoamylase. By-products. Optimization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – AMIOSE E AMIOPECTINA: ESTRUTURAS BÁSICAS	20
FIGURA 2 - CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>Coprinus comatus</i> EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE CRESCIMENTO	24
FIGURA 3 - DIVISÃO ESTRUTURAL DO GRÃO DE TRIGO	37
FIGURA 4 – PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS NO ESTUDO	46
FIGURA 5 - SUBPRODUTOS DE PROCESSAMENTO DO TRIGO: FARINHA DE COLA (FC), FARINHA DE FUNDO DE MOINHO (FFM), FARELO DE TRIGO (FT) E FARINHA DE VARREDURA (FV). ORIGEM E DESTINO FINAL.	47
FIGURA 6 - EFEITO DA ADIÇÃO DE FONTES DE CARBONO (A), FONTES DE NITROGÊNIO (B), DE SAIS (C) E DO pH INICIAL DO MEIO DE CULTIVO (D) NA PRODUÇÃO DE α -AMILASES E GLUCOAMILASES DE <i>Coprinus comatus</i> EM CSm ($X \pm$ desvio-padrão).	62
FIGURA 7 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (A, C e E) E CURVAS DE CONTOURO (B, D e F) MOSTRANDO: (A) E (B) INTERAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE FFM E UREIA NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE; (C) E (D) INTERAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE FFM E UREIA NA PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASE; (E) E (F) CONCENTRAÇÃO DE FFM E K_2HPO_4 NA PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASES DE <i>Coprinus comatus</i> EM CSm.....	71
FIGURA 8- PERFIS DE DESEJABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASES (Y1) E GLUCOAMILASES (Y2) ($U.mL^{-1}$) E NÍVEIS DE DESEJABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO DE FFM, UREIA E K_2HPO_4 PARA OTIMIZAÇÃO CONJUNTA DAS DUAS RESPOSTAS.....	72
FIGURA 9 - RESULTADOS DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE ($U.mL^{-1}$), PRODUÇÃO DE BIOMASSA ($g.L^{-1}$), CONSUMO DE SUBSTRATO ($g.L^{-1}$) E pH AO LONGO DE 240h DE CULTIVO DE <i>C. comatus</i> EM CSm, UTILIZANDO MEIO FFM OTIMIZADO.	74
FIGURA 10 - INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA DE REAÇÃO NAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE PRODUZIDAS POR <i>C. comatus</i> ($X \pm$ DESVIO-PADRÃO).	77

FIGURA 11 – INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE ÍONS Ca^{2+} , Mg^{2+} E Mn^{2+} NA ATIVIDADE DE α -AMILASES E GLUCOAMILASES PRODUZIDAS POR <i>C. comatus</i>	78
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DO AMIDO, LIGAÇÕES HIDROLISADAS E PRODUTOS RESULTANTES	21
TABELA 2 – FONTES DE α -AMILASE, β -AMILASE E GLUCOAMILASES COMERCIAIS	23
TABELA 3 – ESTUDOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS	27
TABELA 4 - FAIXAS DE pH, TEMPERATURA, AGITAÇÃO E TEMPO DE CULTIVO UTILIZADOS EM ESTUDOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS EM CSm	30
TABELA 5 – FONTES DE CARBONO, DE NITROGÊNIO E OUTROS COMPONENTES DE MEIO DE CULTIVO UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS POR CULTIVO SUBMERSO	33
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DE CAUDA, FARELO DE TRIGO E FARINHA DE TRIGO COMUM REPORTADAS NA LITERATURA	38
TABELA 7 – TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	40
TABELA 8 - PATENTES RELACIONADAS À PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS	44
TABELA 9 - PATENTES RELACIONADAS À UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE TRIGO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES	45
TABELA 10 - NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO FRACIONADO 2 ⁵⁻¹ PARA OTIMIZAR A PRODUÇÃO DE AMILASES POR <i>C. comatus</i> EM CSm. X1= FFM; X2= Ureia; X3= K ₂ HPO ₄ ; X4= MgSO ₄ e X5= CaCl ₂	49
TABELA 11 - NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (CONCENTRAÇÃO DE FFM, UREIA E K ₂ HPO ₄) UTILIZADOS NO DCCR	50
TABELA 12 - COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS (FT, FFM, FC e FV) DE SUBPRODUTOS DE TRIGO UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES	57
TABELA 13 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA, MÁXIMA ATIVIDADE E PRODUTIVIDADE DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE PELA CEPA <i>C.</i>	

<i>comatus</i> EM 72, 96 E 120H DE CULTIVO EM MEIOS CONTENDO 10 g.L ⁻¹ DOS DIFERENTES RESÍDUOS TESTADOS (FT, FFM, FC e FV) A 28 °C E 120 RPM.	59
TABELA 14 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2 ⁵⁻¹ UTILIZADO PARA AVALIAR OS EFEITOS DOS COMPONENTES (X1= FFM; X2= Ureia; X3= K ₂ HPO ₄ ; X4= MgSO ₄ E X5= CaCl ₂)DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE AMILASES DE <i>Coprinus comatus</i> EM CSm, pH 6,0, TEMPERATURA 28°C E 120 RPM	65
TABELA 15 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FRACIONADO 2 ⁵⁻¹ SOBRE A ATIVIDADE DE α-AMILASE E GLUCOAMILASE (U.mL ⁻¹). X1= FFM; X2= Ureia; X3= K ₂ HPO ₄ ; X4= MgSO ₄ E X5= CaCl ₂	66
TABELA 16 - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA AVALIAR OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (FFM, UREIA E K ₂ HPO ₄) NA PRODUÇÃO DE α-AMILASE E GLUCOAMILASE DE <i>Coprinus comatus</i> EM CSm, EM pH 6.0, TEMPERATURA 28°C, 120 RPM.	67
TABELA 17 – EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (X ₁ =FFM, X ₂ =UREIA E X ₃ =K ₂ HPO ₄) SOBRE AS RESPOSTAS (ATIVIDADES DE α-AMILASE E GLUCOAMILASE).	68
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO OBTIDO PELO DCCR PARA PRODUÇÃO DE α-AMILASE E GLUCOAMILASE.....	69
TABELA 19 - PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASES DE <i>C. comatus</i> EM MEIO SINTÉTICO (PALUDO et al., 2018) E MEIO FFM OTIMIZADO NO PRESENTE ESTUDO.	74
TABELA 20 - EFICIÊNCIA DA ETAPA DE ULTRAFILTRAÇÃO PARA DESSALINIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE α-AMILASE E GLUCOAMILASE UTILIZANDO FILTROS DE 10 KDa (VIVASPIN 6, GE®, REINO UNIDO).	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

g - Gramas

h - Horas

rpm - Rotações por minuto

min - Minutos

U - Unidade internacional de atividade enzimática

L - Litro

mL – Mililitro

μL – Microlitro

MM – Meio Mínimo

EEB - Extrato Enzimático Bruto

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

CSm - Cultivo submerso

CS – Cultivo em meio sólido

FT – Farelo de Trigo

FFM – Farinha de Fundo de Moinho

FC – Farinha de Cola

FV – Farinha de Varredura

OVAT – *One-Variable-at-Time*

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

ANOVA – Análise de Variância

t_d - Tempo de duplicação

μ_{máx} - Velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹)

μ_s – Velocidade específica de consumo de substrato (h⁻¹)

μ_p – Velocidade específica de formação de produto (h⁻¹)

Y_{xtotal} - Produtividade horária total (g L⁻¹ h⁻¹)

Y_{X/S} – Fator de conversão de substrato em biomassa (gdb.gds⁻¹)

Y_{P/S} – Fator de conversão de substrato em produto (U.gds⁻¹)

Y_{P/X} – Fator de conversão de biomassa em produto (U.gdb⁻¹)

gds - gramas de substrato

gdb - gramas de biomassa

© - copyright

® - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 ENZIMAS	19
2.1.1 Amilases	20
2.1.2 Fontes de amilases	22
2.2 MACROMICETOS	23
2.3 AMILASES DE MACROMICETOS.....	25
2.4 PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE MACROMICETOS	29
2.5 PARÂMETROS DE PROCESSO NO CULTIVO SUBMERSO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES E DE MACROMICETOS	30
2.5.1 pH.....	30
2.5.2 Temperatura.....	31
2.5.3 Agitação.....	31
2.5.4 Tempo de cultivo	31
2.6 COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES	32
2.6.1 Fontes de carbono	33
2.6.2 Fonte de nitrogênio	34
2.6.3 Razão C/N	35
2.6.4 Fosfato e outros nutrientes.....	35
2.7 PROCESSAMENTO DE TRIGO: SUBPRODUTOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	36
2.8 ESTUDO CINÉTICO E OTIMIZAÇÃO DE BIOPROCESSOS	38
2.9 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	39
2.10 PATENTES RELACIONADAS AOS OBJETOS DE INOVAÇÃO DO TRABALHO.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 SUBPRODUTOS DE MOAGEM DO TRIGO.....	46
3.2 CEPA DE MACROMICETO E INÓCULO	47
3.3 SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES	48
3.4 TESTES PRELIMINARES DE SUPLEMENTAÇÃO E pH INICIAL DO MEIO DE CULTIVO.....	48

3.5 OTIMIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTIVO	49
3.5.1 Planejamento fatorial fracionado	49
3.5.2 Delineamento Composto Central Rotacional	49
3.6 CINÉTICA FINAL DO BIOPROCESSO OTIMIZADO	50
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	51
3.7.1 Determinação de atividade α -amilase	51
3.7.2 Determinação de atividade de glucoamilase	51
3.7.3 Quantificação de amido	52
3.7.4 Determinação da Biomassa	53
3.7.5 Determinação do pH	53
3.7.6 Determinação de proteínas e atividade específica	53
3.8 PARÂMETROS DO BIOPROCESSO	53
3.9 FATORES DE CONVERSÃO	54
3.10 PURIFICAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO	55
3.10.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade de α -amilase e glucoamilase	55
3.10.2 Efeito de íons metálicos na atividade de amilases	55
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS SUBPRODUTOS DE MOAGEM DO TRIGO	57
4.2 SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES	59
4.3 TESTES PRELIMINARES DE SUPLEMENTAÇÃO E AJUSTE DE PH INICIAL DO MEIO DE CULTIVO	62
4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO	65
4.5 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	67
4.6 CINÉTICA FINAL DO BIOPROCESSO OTIMIZADO	73
4.7 PARÂMETROS CINÉTICOS E FATORES DE CONVERSÃO	74
4.8 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	76
4.9 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS AMILASES	76
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido ou glicogênio em dextrinas, maltose e glicose (SIMAIR et al, 2017). Estas enzimas são utilizadas em diversos processos nas indústrias têxtil, farmacêutica, de papel e celulose, alimentícia e de ração animal (SINDHU et al, 2017). Na indústria de alimentos, as amilases desempenham importante papel na produção de xaropes e adoçantes, na panificação, processamento de cereais e produção de bebidas (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Tendo em vista a diversidade de aplicação, a comercialização de amilases corresponde a aproximadamente 30% do mercado mundial de enzimas (NAILI et al., 2016; SINDHU et al., 2017).

As amilases comercializadas e utilizadas industrialmente são majoritariamente de origem microbiana. Nos últimos anos, o estudo de diferentes fontes microbianas produtoras de amilases tem sido de grande interesse. Porém, o uso de macromicetos, ou cogumelos, reconhecidos como bioconversores de matéria orgânica em condições naturais e potenciais produtores de enzimas extracelulares é pouco explorado (SPIER et al, 2015; PERALTA et al. 2017).

O Cultivo Submerso (CSm) é mais utilizado para produção de diversos metabólitos microbianos devido à maior facilidade de manipulação e controle dos parâmetros do processo quando comparado ao cultivo em estado sólido (CS) (GANGADHARAN et al., 2008; NAILI et al. 2016). A produção de amilases em cultivo submerso é influenciada não somente pela fonte microbiana utilizada, como pela manipulação correta de um conjunto de parâmetros, como a composição do meio de cultivo, pH, agitação, aeração e temperatura. (SUÁREZ-ARANGO, 2013). A produção de enzimas de fontes microbianas por CSm, no entanto, pode apresentar custos elevados, que têm sido atribuídos principalmente à formulação dos meios de cultivo utilizados e consumo energético dos biorreatores (IMEN; MAHMOUD, 2015; PANESAR et al., 2016). Desta forma, a otimização de parâmetros do bioprocesso e a utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilases tem merecido enfoque nos últimos anos como alternativas para redução de custos de processo.

Dentre os diversos segmentos agroindustriais existentes, o processamento de trigo é um dos mais relevantes. Na safra 2017/2018 foram produzidas 750 milhões de toneladas do grão (USDA, 2018), com um rendimento aproximado de 75% para a produção de farinha. Os 25% restantes (o que corresponderia a mais de 180 milhões de toneladas da produção mundial) são considerados resíduos agroindustriais e subprodutos. O farelo de trigo, gérmen, além de farinhas de baixa purificação e resíduos provenientes da limpeza dos moinhos são exemplos de

resíduos gerados no processamento (NEVES et al., 2006a, CLÉMENT et al., 2018), os quais são geralmente destinados à produção de ração animal, mesmo apresentando elevado potencial para utilização em processos biotecnológicos. O farelo de trigo, por exemplo, já foi utilizado em estudos para produção de amilases de microrganismos (EL-ZALAKI; HAMZA, 1979; KEKOS et al., 1987, ZILLY et al., 2012). No entanto, não existem estudos sobre a utilização de outros subprodutos do trigo para produção de amilases a partir dessas fontes.

Estudo anterior (PALUDO et al., 2018) selecionou a cepa de microrganismo *Coprinus comatus* como potencial produtora de amilases em CSm, utilizando meio de cultivo sintético. No presente estudo pretende-se avaliar o potencial de utilização de quatro subprodutos de moagem do trigo para produção de amilases de *Coprinus comatus* em cultivo submerso, possibilitando a obtenção de amilases de uma fonte ainda não explorada comercialmente, a partir de um processo de baixo custo.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo consistiu em caracterizar parcialmente diferentes resíduos e subprodutos obtidos do processo de moagem do trigo e verificar o potencial de utilização para produção de amilases de *Coprinus comatus* por cultivo submerso (CSm).

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar quatro subprodutos de moagem do trigo quanto à sua composição centesimal e perfil de minerais;
- Selecionar um dos subprodutos e avaliar a influência da suplementação do meio na produção das enzimas;
- Otimizar a composição do meio de cultivo utilizando delineamentos experimentais (Planejamento Fatorial Fracionado e Delineamento Composto Central Rotacional);
- Realizar a cinética final do bioprocesso otimizado e determinar o tempo de cultivo com máxima produção das enzimas, bem como os parâmetros do bioprocesso e fatores de conversão;
- Concentrar o extrato enzimático (purificação de baixa resolução) e caracterizar as enzimas produzidas;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que desempenham funções catalíticas fundamentais nos processos bioquímicos e responsáveis por inúmeros processos metabólicos de um organismo vivo. Estes catalisadores biológicos são extremamente eficientes, apresentam grande especificidade por seus substratos e atuam em soluções aquosas, sob condições brandas de temperatura e pH (PORTER et al., 2016; SINDHU et al., 2017).

Em decorrência da sua forma de atuação, a utilização de enzimas em substituição a catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos torna o processo mais eficiente, formando quantidades menores de subprodutos, e, conseqüentemente, reduzindo os custos. Devido a isso, a aplicação de enzimas torna-se cada vez mais atrativa em diversos setores industriais (ZANOTTO, 2003; SHELDON; PELT, 2013; ADRIO; DEMAÏN, 2014).

O mercado mundial de enzimas movimentou cerca de 8 bilhões de dólares somente em 2015 e estima-se que o setor movimente mais de 17 bilhões de dólares até 2024 (GRAND VIEW RESEARCH, 2016; FREEDONIA GROUP, 2016). Enzimas destinadas às indústrias dos segmentos têxteis, papel, amido, couro, produtos de limpeza e de higiene representam 65% das vendas. Enzimas para indústrias de alimentos correspondem a 25% do mercado e enzimas para ração animal contribuem com 10% das vendas (KUMAR; SINGH, 2013).

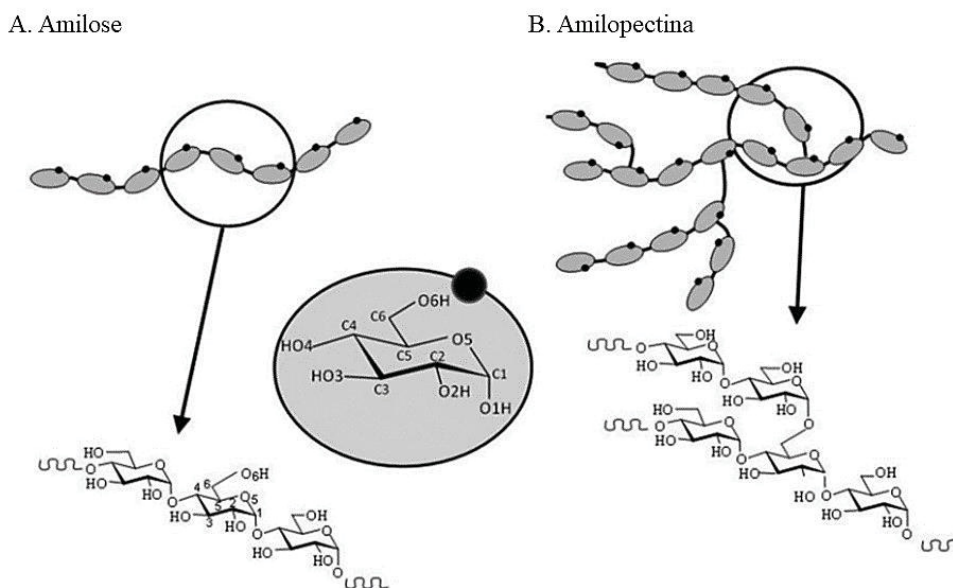
As enzimas utilizadas industrialmente podem ser de origem animal (renina, pepsina, pancreatina), vegetal (papaína, bromelina) ou microbiana (glucoamilases, α -amilases) (VITOLO, 2009). A obtenção de enzimas de fonte vegetal ou animal pode sofrer com a sazonalidade. Por outro lado, a obtenção destes produtos de fontes microbianas torna-se vantajosa devido à diversidade bioquímica das enzimas produzidas, à possibilidade de produção em grande escala e com regularidade, à simplicidade dos requerimentos nutricionais e à fácil manipulação genética dos micro-organismos produtores (BON et al., 2008; ZHANG; KIM, 2010).

2.1.1 Amilases

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise da molécula do amido, principal fonte de reserva de carboidratos de vegetais superiores, e segundo polímero de maior abundância na célula vegetal, depois da celulose (EVERT; EICHHORN, 2014).

O amido é um homopolissacarídeo formado por duas estruturas quimicamente semelhantes: a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero essencialmente linear, formado por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina é uma cadeia ramificada, formada por cadeias de glicose ligadas por ligações α -1,4 e ramificações unidas a elas por ligações α -1,6 (Figura 1). Cada espécie vegetal possui um padrão morfológico de amido, com diferentes proporções de amilose e amilopectina. Esta última constitui cerca de 75% da cadeia da maioria dos amidos (FREITAS, 2002; PÉREZ; BERTOFT, 2010; EVERT; EICHHORN, 2014).

FIGURA 1 – AMIOLOSE E AMIOPECTINA: ESTRUTURAS BÁSICAS



FONTE: PÉREZ; BERTOFT (2010)

Na Tabela 1 são apresentadas as diversas enzimas envolvidas na hidrólise do amido, assim como o tipo de ligação hidrolisada por elas e os produtos resultantes. As amilases são usualmente classificadas em dois grupos: endoamilases e exoamilases. As endoamilases hidrolisam ligações no interior da molécula do amido, de forma aleatória, formando oligossacarídeos. Já as exoamilases hidrolisam as ligações a partir da extremidade não-redutora, resultando em polissacarídeos de cadeia curta e monômeros de glicose (GUPTA et al., 2003;

SINDHU et al., 2017). Das enzimas listadas, a α -amilase é uma endoamilase, enquanto que as demais são classificadas como exoamilases. Algumas enzimas, como a isopululanase, não atuam diretamente na molécula do amido, mas são importantes no processo de hidrólise (SILVA, 2014).

TABELA 1 - ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DO AMIDO, LIGAÇÕES HIDROLISADAS E PRODUTOS RESULTANTES

Enzima	Ligações hidrolisadas	Produto
α -Amilase EC 3.2.1.1 1,4 α -D-glucano-glucanohidrolase	Ligações α -1,4 internas da amilose e amilopectina	Oligossacarídeos.
β -Amilase EC 3.2.1.2 α -D-glucano maltohidrolase	Penúltima ligação α -1,4 da extremidade não-redutora da cadeia de amido	Maltose
Glucoamilase EC 3.2.1.3 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase	Ligações terminais α -1,4 dos extremos não-redutores; ligações α -1,6.	β -D-glicose
α -D-glucosidase EC 3.2.1.20 α -D-glucosideo glucosidase	Ligações α -1,4 e α -1,6 de polissacarídeos e oligossacarídeos de cadeia curta, a partir da extremidade não redutora	D-glicose
Exo-(1,4)- α -D-glucanase EC 3.2.1.60 / 3.2.1.98	Ligações α -1,4, assim como as β -amilases	Maltotetraose e Maltohexaose
Pululanase EC 3.2.1.41 α -dextrina-6-glucosidase	Ligações α -1,6 do pululano (produto da hidrólise do amido)	Maltotrioses
Isopululanase EC 3.2.1.57 pululano-4-glucanohidrolase	Ligações α -1,4 do pululano; não têm ação direta sobre o amido.	Isopanose
Isoamilase EC 3.2.1.68 glicogênio-6-glucanohidrolase	Ligações α -1,6 da amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos.	Malto-oligossacarídeos

FONTE: ROBINSON (1991); SILVA (2014).

Alguns autores atribuem às amilases 25% de participação no mercado mundial de enzimas (SAXENA et al., 2007; SINDHU et al., 2017). Dentre as amilases conhecidas e listadas na Tabela 1, a α -amilase, β -amilase e glucoamilase (ou amiloglucosidase) são as enzimas de maior interesse para indústria de alimentos, cujos processos muitas vezes envolvem ação sinérgica de duas ou mais enzimas amilolíticas. No processo de obtenção de xaropes de frutose, por exemplo, utiliza-se α -amilase em uma primeira etapa, conhecida como liquefação, seguida da sacarificação utilizando-se uma glucoamilase, que resulta em liberação de glicose. A glicose então é convertida a frutose por ação de outra enzima, a glicose isomerase. A utilização de β -amilases neste processo resulta em xarope de maltose (SILVA, 2014; SUNDARRAM; MURTHY, 2014).

Na panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura aos pães. Estas enzimas atuam sobre o amido presente na farinha de trigo, aumentando a disponibilidade de açúcares fermentescíveis. Consequentemente, aumenta-se a taxa de fermentação e liberação de CO₂ pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A adição de amilases também contribui com a redução da viscosidade da massa, além de prevenir características indesejáveis no produto final, como a perda de umidade. Os açúcares formados na hidrólise do amido tornam-se disponíveis para participar da reação de Maillard, responsável por características sensoriais importantes (GUPTA et al., 2003; SPIER, 2005; SUNDARRAM; MURTY, 2014; TIWARI et al., 2015)

Tiwari et al. (2015) citam ainda a aplicação das amilases no tratamento da pasta de cacau para produção de xarope de chocolate, no tratamento da cana-de-açúcar em indústrias de açúcar e glicose, além de ressaltar a importância das β -amilases naturalmente presentes no malte para produção de bebidas como cerveja e uísque. Na produção de cereais infantis como farinha láctea à base de milho, mingau de milho, arroz e mistura de cereais, a adição de amilases diminui a viscosidade da mistura de cereais e facilita o escoamento em tubulações (SPIER, 2005).

2.1.2 Fontes de amilases

As α -amilases e glucoamilases são obtidas majoritariamente de fonte microbiana. As fontes primárias de β -amilases são sementes de plantas superiores e raízes de batata-doce (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Na Tabela 2 são apresentadas algumas das fontes de α -amilases, β -amilases e glucoamilases comercialmente disponíveis.

TABELA 2 – FONTES DE α -AMILASE, β -AMILASE E GLUCOAMILASES COMERCIAIS

Tipo de amilase	Fonte	Nome/código comercial	Fabricantes
α -amilase	<i>Bacillus licheniformis</i>	A3403 Termamyl® BioConvert – ALKA Spezyme® CL	Sigma-Aldrich Novozymes Noor Enzymes Dupont™
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	A7595 BAN™	Sigma-Aldrich, Novozymes
	<i>Bacillus subtilis</i>	10069, 10070	Sigma-Aldrich
	<i>Aspergillus oryzae</i>	A9857 Fungamyl®	Sigma-Aldrich, Novozymes
	<i>Trichoderma reesei</i>	Spezyme® RSL	Dupont
Glucoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	A7095, A7420 AMG 300L™ BioConvert – ACGA Diazyme® X4	Sigma-Aldrich Novozymes Noor Enzymes Dupont
	<i>Rhizopus Sp.</i>	A9228	Sigma-Aldrich
β -amilase	Batata doce	A7005	Sigma-Aldrich
	Malte	A7130 Novamyl®	Sigma-Aldrich, Novozymes
	<i>Bacillus cereus</i> (recombinante)	NATE-1052	Creative Enzymes

Como pode ser visualizado na Tabela 2, linhagens fúngicas dos gêneros *Aspergillus* sp. *Trichoderma* sp. e *Rizophus* são utilizadas para produção de amilases de uso comercial. A capacidade de degradação de diversos substratos por espécies pertencentes ao reino Fungi justifica sua utilização como fontes produtoras de diversas enzimas (RYTIOJA et al., 2014). Além disso, as enzimas produzidas por fungos são geralmente extracelulares, o que facilita e reduz custos no processo de recuperação (NEGI; VIBHA, 2017). Dentre as espécies listadas na Tabela 2, no entanto, nenhuma pertence ao grupo de fungos conhecido como “macromicetos” e não há registros da obtenção de amilases da espécie de macromiceto *Coprinus comatus*.

2.2 MACROMICETOS

Os macromicetos são seres pertencentes ao reino Fungi, e aos filós Ascomycota (ascomicetos) ou Basidiomycota (basidiomicetos), cuja estrutura produtora de esporos é

macroscópica, podendo ser visualizada a olho nu. Esta estrutura é denominada “corpo de frutificação” (ou basidioma, para os basidiomicetos), e popularmente conhecida como cogumelo (MORADALI et al., 2007; PERALTA et al., 2017).

Algumas espécies de macromicetos são comestíveis e têm sido vastamente estudadas quanto às suas propriedades medicinais. Propriedades anticancerígenas e antitumorais, hipocolesterolêmicas, antivirais, antibacterianas e imunomoduladoras já foram reportadas em basidiomicetos dos gêneros *Agaricus*, *Coprinus*, *Flammulina*, *Grifola*, *Pleurotus* e *Lentinus*, por exemplo. Estima-se que existam cerca de 1800 espécies de macromicetos, 700 delas com propriedades medicinais (SUÁREZ-ARANGO; NIETO, 2013; SPIER et al., 2015).

A espécie *Coprinus comatus* (Figura 2) é um macromiceto comestível encontrado no mundo todo e apreciado pelo seu valor nutricional, sabor e aparência únicos (LI et al, 2010). Desenvolve-se naturalmente no campo e em jardins durante a primavera e outono, e seu cultivo para fins comerciais tem crescido recentemente nos países asiáticos. No entanto, esta espécie deve ser coletada em estágios iniciais de maturação e consumida em um curto período de tempo devido à alta perecibilidade (REYES et al., 2009; STOJKOVIC' et al., 2013; ZHAO et al., 2014).

FIGURA 2 - CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *Coprinus comatus* EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE CRESCIMENTO



FONTE: STEVENS (2014)

C. comatus e as demais espécies de macromicetos possuem vasta aplicação biotecnológica, e representam potenciais fontes de enzimas de interesse comercial. O seu metabolismo heterotrófico, que envolve a decomposição do substrato para posterior assimilação

dos nutrientes através de mecanismos enzimáticos, pode ser considerado um indício disso (MORADALI et al., 2007; EVERT; EICHHORN, 2014; PERALTA et al., 2017).

Em condições naturais, diversas espécies de ascomicetos e basidiomicetos estão associados à decomposição da madeira devido à sua capacidade única de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas (SŁAWIŃSKA; KALBARCZYK, 2011). Espécies como *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma aplanatum*, *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* são conhecidos como fungos de “podridão branca” da madeira, e grande parte dos estudos sobre a produção enzimática de macromicetos têm sido voltados para enzimas lignocelulolíticas (PERALTA et al., 2017). Diversos estudos reportaram a produção e aplicação de lacases de *C. comatus* (LU; DING, 2010; JIANG; TEM; DING, 2013; ZHAO et al., 2014; MA; RUAN, 2015). A produção de amilases por espécies deste grupo de fungos tem sido explorada por alguns estudos, mas ainda em menor escala do que enzimas lignocelulolíticas.

2.3 AMILASES DE MACROMICETOS

Na Tabela 3 estão listados alguns estudos que avaliaram a produção de amilases de macromicetos, a forma de cultivo, o tipo de amilase quantificada e detalhes sobre a condução dos experimentos.

Estudos preliminares para identificar linhagens produtoras de amilases costumam ser realizados em placas de Petri contendo meio sólido. A produção enzimática é avaliada pela formação de halos de hidrólise na região de crescimento micelial. Alguns estudos de *screening* têm encontrado resultados positivos para produção de amilases por macromicetos. Goud et al. (2009) analisaram o perfil enzimático de 50 cepas de basidiomicetos isolados no sul da Índia. Destas, 28 (46%) foram capazes de produzir amilases. Krupodorova et al. (2014) analisaram qualitativamente a produção de amilases de 30 cepas de macromicetos, obtendo resultado positivo para todas as cepas avaliadas.

Alguns estudos também reportam a extração de amilases dos basidiomas de cogumelos (TATSUMI et al., 2016; KHAUND; JOSHI, 2014; UDDIN et al. 2013; DU et al., 2013). No entanto, esta forma de obtenção não é a mais adequada, pelo tempo de cultivo necessário para produção do corpo de frutificação, e pelas etapas adicionais relacionadas à manipulação do cogumelo e extração da enzima.

Dentre as espécies já estudadas apresentadas na Tabela 3, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum* e *Lentinus edodes* foram reportadas como produtoras de amilases em dois ou mais estudos (ERGUN; UREK, 2017; DÍAZ-GODÍNEZ et

al., 2016; INÁCIO et al., 2015; ZILLY et al., 2012; SLAWINSKA; KALBARCZYK, 2011; HAN et al., 2005; LEATHAM, 1985; EL-ZALAKI; HAMZA, 1979). A produção de amilases de *Coprinus comatus* até então foi avaliada apenas em estudos qualitativos (KRUPODOROVA et al., 2014) e em cultivo submerso utilizando meio sintético (PALUDO et al., 2018).

Os resultados dos estudos apresentados na Tabela 3 evidenciam o potencial de produção de amilases por diferentes cepas de macromicetos, dentre estas *C. comatus*. Além da seleção de espécies potenciais, os estudos relacionados à produção de amilases de macromicetos diferenciam-se pelo tipo de cultivo utilizado (submerso ou sólido) e avaliam uma série de parâmetros importantes no cultivo e produção de enzimas deste grupo de fungos como a composição de meios de cultivo, pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo.

TABELA 3 – ESTUDOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS

Espécie	Tipo de cultivo	Tipo de amilase quantificada	Comentários	Referência
<i>Coprinus comatus</i>	CSm	α -amilase e glucoamilase	<i>Coprinus comatus</i> foi selecionado como melhor produtor de amilases em cultivo submerso. As condições de cultivo foram otimizadas e as atividades chegaram a 5,84 U.mL ⁻¹ e 8,87 U.mL ⁻¹ .	Paludo et al. (2018)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CS	α -amilase	Cultivo sólido de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizando cascas de batata. A máxima atividade amilolítica obtida foi de 0,006 U.mL ⁻¹ .	Ergun e Urek (2017)
<i>Coprinus comatus</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>Hohenbuehelia myxotricha</i> , <i>Lepista luscina</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , entre outros	Crescimento micelial em placa	Amilase total Halos de hidrólise	As 30 cepas estudadas, que incluíam <i>Coprinus comatus</i> , apresentaram atividade de amilases (análise qualitativa).	Krupodorova et al. (2014)
<i>Pleurotus pulmonarius</i> e <i>Picnoporus cinnabarinus</i>	CSm	Amilase total	O estudo avaliou a produção de diversas enzimas em cultivo submerso das espécies em biorreator tipo air-lift. As amilases foram as enzimas mais produzidas para ambas espécies. As atividades chegaram a cerca de 2,5 U.mL ⁻¹ em 200h de cultivo.	Díaz-Godínez et al. (2016)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	CS	Amilase total	Cultivo em estado sólido da espécie em resíduos de laranja. A máxima atividade obtida foi de 1,1 U.mL ⁻¹ em 5 dias de cultivo.	Inácio et al. (2015)
<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> , <i>Macrocybe titans</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Grifola frondosa</i>	CS	Amilase total	As maiores atividades encontradas para amilases foram de 0,09 U.mL ⁻¹ , por <i>P. pulmonarius</i> e <i>M. titans</i> em cultivo de farelo de trigo.	Zilly et al. (2012)
<i>Tricholoma matsutake</i>	CSm	Glucoamilase	A produção inicial de glucoamilase foi avaliada utilizando-se diferentes fontes de carbono. Os maiores resultados foram obtidos utilizando-se amilose (16.01 U.mL ⁻¹).	Wan et al. , (2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CS	Amilase total	A atividade amilolítica foi avaliada em CS em vários estágios de desenvolvimento micelial. A maior atividade foi 87,2 μ g de glucose.gds ⁻¹ por h.	Slawinska e kalbarczyk (2011)
<i>Agaricus blazei</i> , <i>Agaricus</i> sp., <i>Coriopsis occidentalis</i> , <i>Cortolus versicolor</i> , <i>Termitomyces clypeatus</i> , <i>Termitomyces globulus</i> , <i>Pleurotus tuber-regium</i> , <i>Podoscypha bolleana</i> , <i>Pogonomyces litydnoides</i> e <i>Nothopanus hygrophanus</i>	CSm	Amilase total	A produção de amilases pelas espécies foi avaliada utilizando diversas fontes de carbono, nitrogênio, pH e temperatura. A maior atividade de 0,6 U.mL ⁻¹ por <i>Agaricus blazei</i> .	Jonathan e Adeoyo (2011)

50 Basidiomicetos do Sul da Índia	Crescimento micelial em placa	Amilase total Halos de hidrólise	46% das espécies isoladas amilolítica.	apresentaram atividade	Goud <i>et al.</i> (2009)
As espécies <i>Picnoporus sanguineus</i> , <i>Ganoderma</i> sp. 2A2, <i>Trametes</i> sp. 11E4 e <i>Stereum</i> sp. 6D2 foram selecionadas como produtoras de amilases nos testes prévios. O cultivo das demais linhagens em meio contendo farelo de trigo foi capaz de induzir a produção das enzimas.					
10 basidiomicetos isolados na Amazônia brasileira	CSm	Amilase total em ensaios <i>cup plate</i>			Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>Ganoderma lucidum</i>	CS	α -amilase	Cultivo sólido da espécie em farinha de milho. Máxima atividade foi de 267 U·gds ⁻¹ em 20 dias de incubação		Han <i>et al.</i> (2005)
<i>Hericium erinaceum</i>	CS	α -amilase	Cultivo sólido da espécie em farinha de milho. Máxima atividade obtida foi de 179 U·gds ⁻¹ em 20 dias de incubação.		Han <i>et al.</i> (2003)
<i>Lycophyllum shimeji</i> , <i>Tricholoma lobayense</i> , <i>Morcella elata</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Coriolus versicolor</i> e <i>Volvariella volvacea</i>	CSm	Amilase total	<i>P. sajor-caju</i> produziu aprox. 0,18 U·mL ⁻¹ em meio formulado com resíduo de soja e suplementado, máxima atividade enzimática obtida no estudo.		Buswell e Chang (1994)
<i>Calvatia gigantea</i>	CSm	Amilase total	A adição de sais e fontes de nitrogênio em meio formulado com farelo de trigo aumentou a produção de amilases por esta espécie. A atividade máxima chegou a 60,4 U·mL ⁻¹ .		Kekos <i>et al.</i> (1987)
<i>Lentinus edodes</i>	CS	Glucamilase	A atividade de glucamilase foi maior entre os primeiros 30 dias de cultivo, cerca de 1 U por cultivo. A frutificação em 90 dias de cultivo induziu a produção da enzima.		Leatham (1985)
<i>Ganoderma lucidum</i>	CSm	Amilase total	As amilases provenientes do caldo de cultivo foram parcialmente purificadas e caracterizadas, chegando a uma atividade máxima de aprox. 13 U·mL ⁻¹ .		Do e Kim (1985)
<i>Abtsidia blakesleeana</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Peziza aubouruniv</i> e <i>Polyporus sulphureus</i>	CSm	N.E.	Foi realizado estudo qualitativo e quantitativo. <i>Lentinus edodes</i> teve a maior produção de amilases, de 619 U·mL ⁻¹ .		El-Zalaki e Hamza (1979)

2.4 PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE MACROMICETOS

Na produção de enzimas por micro-organismos existem principalmente dois tipos de processos: o cultivo sólido (CS) conhecido como fermentação no estado sólido (FES), e o cultivo submerso (CSm) conhecido como fermentação submersa (FS) (SUNDARRAM; MURTHY, 2014).

A produção de enzimas tem sido conduzida preferencialmente em CSm, por proporcionar uma maior facilidade de controle dos parâmetros físicos e químicos do processo, maior absorção dos nutrientes do meio e maior facilidade de excreção de metabólitos pela célula microbiana (BON et al., 2008; SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Dentre as principais desvantagens citadas na utilização deste tipo de processo, está o alto custo dos meios de cultivo sintéticos tradicionalmente utilizados (GANGADHARAN; SIVARAMAKRISHNAN, 2009).

O cultivo sólido é a forma tradicional de cultivo de cogumelos comestíveis, uma vez que este tipo de processo permite a obtenção do corpo de frutificação para fins alimentícios, além de ser utilizado para extração de enzimas e de metabólitos terapêuticos (THOMAS et al. 1998). Este tipo de processo se assemelha às condições naturais de habitat das espécies fúngicas e pode ser altamente produtivo. No entanto, apesar de ter sido vastamente estudado e aprimorado ao longo dos anos, a baixa transferência de oxigênio e gás carbônico, dificuldade de remoção de calor e maior facilidade de contaminação faz com que este processo seja pouco utilizado para produção de enzimas em escala industrial (BON et al. 2008; SUÁREZ ARANGO; NIETO, 2013).

Grande parte dos estudos referentes à produção de amilases, assim como de outras enzimas de macromicetos, tem conduzido os experimentos em CS, por associar o cultivo destes macro-organismos com a bioconversão de resíduos agroindustriais, o que possibilita a redução de custos (RASHAD et al., 2009; HUERTA MORALES et al., 2014; INÁCIO et al., 2015; AMIN et al., 2017).

Apesar da menor velocidade de crescimento em relação a bactérias e outros fungos, o CSm pode ser utilizado para cultivo e produção de enzimas de macromicetos, otimizando-se o processo diante da linhagem estudada e do metabólito de interesse (SUÁREZ-ARANGO; NIETO, 2013). Nove dos estudos listados na Tabela 3 utilizaram o CSm como forma de cultivo para produção de amilases de macromicetos, o que sugere a adaptabilidade destas espécies ao cultivo submerso. A associação do CSm à utilização de resíduos, como forma de redução de custos, foi reportada em apenas 4 deles, apesar de ter se mostrado promissora no estudo realizado por Souza *et al.* (2008). Poucos dos estudos listados realizaram a otimização dos

parâmetros de processo para adaptar o cultivo submerso à linhagem e ao produto de interesse, como recomendado por Suárez Arango e Nieto (2013).

2.5 PARÂMETROS DE PROCESSO NO CULTIVO SUBMERSO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES E DE MACROMICETOS

Durante o cultivo submerso de macromicetos, alguns parâmetros podem influenciar no crescimento micelial, rendimento de biomassa e produção de metabólitos, tais como as enzimas. Dentre os parâmetros físico-químicos de importância estão o pH, a aeração/agitação e temperatura, além do tempo de cultivo. Na Tabela 4 estão apresentadas as faixas de pH, temperatura/tempo de incubação e agitação/aeração utilizadas em estudos para produção de amilases de macromicetos conduzidos em cultivo submerso.

TABELA 4 - FAIXAS DE pH, TEMPERATURA, AGITAÇÃO E TEMPO DE CULTIVO UTILIZADOS EM ESTUDOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS EM CSm

Parâmetro	Faixa utilizada
pH	3,8 a 7,8
Temperatura	25°C a 40°C
Agitação	120 a 200 rpm
Tempo de cultivo	2 a 14 dias

FONTE: KEKOS et al. (1987); BUSWELL; CHANG (1994); SOUZA et al. (2008); JONATHAN; ADEOYO (2011).

2.5.1 pH

Durante o processo fermentativo, o pH pode influenciar tanto no crescimento microbiano quanto na estabilidade da enzima produzida, uma vez que pode atuar como um fator desnaturante (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Macrofungos usualmente crescem em uma faixa de pH entre 4 e 7,5. Para evitar contaminação microbiana, podem ser utilizados pHs mais ácidos, mas deve-se avaliar a influência na produção do metabólito de interesse (SUÁREZ ARANGO; NIETO, 2013). Os ensaios para produção de amilases de macromicetos usualmente utilizam uma faixa de pH inicial do meio de cultivo entre 5,5 e 6,5. Jonatan e Adeoyo (2011) avaliaram a produção de amilases por 11 espécies de basidiomicetos em pHs iniciais de 3,8; 4,8; 5,8; 6,8 e 7,8. Os resultados obtidos por estes autores demonstram que *Agaricus blazei* foi o melhor produtor de amilases em pHs entre 4,8 e 7,8, com os maiores resultados em pH 6,8

(0,6 U.mL⁻¹). Neste mesmo estudo, foi possível observar que a produção de amilases pelas espécies em questão foi reduzida em pHs extremos (3,8 e 7,8).

2.5.2 Temperatura

Assim como o pH, a temperatura afeta tanto o crescimento microbiano quanto a estabilidade da enzima. A faixa de temperatura utilizada em estudos de produção de biomassa de macromicetos por cultivo submerso está entre 24 a 40°C (SUÁREZ ARANGO; NIETO, 2013). Esta faixa de temperatura foi avaliada na produção de enzimas de *Agaricus blazei*, *Agaricus sp.*, *Coriolopsis occidentalis*, *Coriolus versicolor*, *Termitomces clypeatus*, *Termitomyces globulus*, *Pleurotus tuber-regium*, *Podoscypha bolleana*, *Pogonomyces hydroidese* *Nothopanus hygrophanus* por Jonatan e Adeoyo (2011), cujos resultados revelaram maior atividade amilolítica entre 25°C e 30°C. Esta faixa de temperatura também é utilizada nos demais estudos para produção de amilases por cultivo submerso de macromicetos apresentados na Tabela 4.

2.5.3 Agitação

A agitação promove a suplementação de oxigênio durante cultivo (processo denominado de aeração por difusão) e a mistura dos nutrientes no meio de cultivo (GUPTA et al., 2003; RUIZ et al., 2017). Para Kammoun et al. (2008), aumentar a agitação pode aumentar a produção da enzima, até um certo limite, já que a aeração é importante no crescimento de micro-organismos aeróbios. A agitação de 250 rpm, associada com outros parâmetros otimizados, demonstrou maior resultados na produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* no estudo realizado por estes autores. No entanto, agitações muito altas podem ser prejudiciais ao crescimento micelial, interferindo na produção de enzimas (GUPTA et al., 2003). Agitações entre 120 e 200 rpm foram utilizadas para produção de amilases por cultivo submerso de macromicetos (Tabela 4).

2.5.4 Tempo de cultivo

Segundo Sundarram e Murthy (2014), o tempo de cultivo é um fator crucial na produção de enzimas. Quando muito curto, a produtividade pode não atingir o seu máximo e quando muito longo, pode resultar em um decréscimo na atividade enzimática. Isso pode

acontecer devido à redução do substrato indutor no meio de cultivo em tempos muito longos ou até devido à formação de substâncias tóxicas ou repressoras. A produção de enzimas amilolíticas por *Trametes* sp., *Pycnoporus* sp., *Ganoderma* sp., *Stereum* sp., *Daedalea* sp., *Cantharellus* sp. e *Pleurotus* sp. foi detectada a partir do quinto dia por Souza et. al. (2008). A produção máxima de amilases por *C. comatus* foi detectada entre 44 e 48h por PALUDO et al. (2018), tempo reduzido considerando-se que os macromicetos são fungos de desenvolvimento lento (VINOGRADOVA; KUSHNIR, 2003). O tempo de cultivo necessário para máxima produção enzimática deve ser avaliado pois pode variar até mesmo para uma mesma espécie, dependendo da composição nutricional do meio de cultivo e dos demais parâmetros físico-químicos do processo.

2.6 COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES

As necessidades nutricionais para o crescimento microbiano são divididas em macro e micronutrientes e são específicas para um micro-organismo em particular. Desta forma, a composição e concentração do meio de cultivo, além das condições de cultivo, afetam diretamente o crescimento e produção de enzimas microbianas (GANGADHARAN; SIVARAMAKRISHNAN, 2009). Fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio e potássio são tidos como principais macronutrientes e são considerados limitantes do crescimento microbiano. A ausência ou presença destes nutrientes no meio de cultivo acarreta uma série de modificações metabólicas (HARDER; DIJKHUIZEN, 1983), que podem ser desejáveis ou indesejáveis, dependendo do metabólito de interesse.

A concentração de macro e micronutrientes é importante na formulação de meios de cultivo e deve ser ajustada de forma a otimizar a produção de amilases. Na Tabela 5 são apresentados os componentes de meios de cultivo utilizados para produção de amilases de macromicetos em CSm.

TABELA 5 – FONTES DE CARBONO, DE NITROGÊNIO E OUTROS COMPONENTES DE MEIO DE CULTIVO UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS POR CULTIVO SUBMERSO

Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Outros componentes do meio de cultivo	Referência
Amido solúvel	Ureia	KH ₂ PO ₄ FeSO ₄ .7H ₂ O	Paludo et al. (2018)
Glicose	Extrato de levedura + (NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ CuSO ₄ MnSO ₄ ZnSO ₄	Díaz-Godínez et al. (2016)
Amido de milho, amido solúvel, amido de trigo, amido de batata inglesa e doce, amilose.	Extrato de levedura	KH ₂ PO ₄	Wan et al. (2012)
Glicose, maltose e sacarose	Nitrato de sódio, peptona, extrato de levedura e ureia	KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ FeSO ₄	Jonathan e Adeoyo (2011)
Amido de milho Maltose Farelo de trigo	Extrato de levedura + (NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄	Souza et al. (2008)
Resíduos de soja	Asparagina	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄	Buswell e Chang (1994)
Farelo de trigo	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NaNO ₃ , caseína e extrato de levedura	NaCl, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄	Kekos et al. (1987)
Caldo batata dextrose	-	-	Do e Kim (1985)
Malte, casca de laranja, casca de batata, farelo de arroz, extrato de milho e extrato de arroz	-	-	El-Zalaki e Hamza (1979)

2.6.1 Fontes de carbono

Algumas enzimas são indutíveis, isto é, sua produção é estimulada pelas condições do ambiente, principalmente pela presença do substrato (BON et al., 2008). Pode também ocorrer repressão catabólica da síntese enzimática pela presença de açúcares facilmente assimiláveis (SANT'ANNA JR., 2001; RUIZ et al., 2017).

Na produção de amilases, além do amido, a maltose, produto de sua hidrólise, também é considerada uma fonte de carbono indutora. A presença de glicose e frutose já foi reportada

como indutora ou repressora, dependendo da espécie de micro-organismo estudada (GUPTA et al., 2003; SILVA, 2014).

A influência da fonte de carbono para a produção de amilases tem sido vastamente estudada para diversos micro-organismos, como *Aspergillus oryzae* (NAILI et al., 2016), *Aspergillus niger* (SPIER et al., 2006; ADEJUWON et al., 2012), *Streptomyces* sp. (SINGH et al., 2012) e *Bacillus* sp (DEB et al., 2013), que são alguns dos gêneros utilizados na produção de amilases comerciais. Nestes estudos, os autores avaliaram a produção de enzimas amilolíticas utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono alternativa, em substituição ao amido utilizado em meios sintéticos.

Farinha, farelo de milho e de trigo já foram testados e se mostram efetivos para indução da produção de amilases por macromicetos em CS (KEKOS et al., 1987; HAN, 2003; HAN et al., 2005; SŁAWIŃSKA; KALBARCZYK, 2011). Em cultivo submerso, malte, casca de laranja, casca de batata, farelo de arroz, extrato de milho extrato de arroz, farelo de trigo, resíduos de soja, glicose, maltose e sacarose foram algumas das fontes de carbono testadas para produção de amilases de macromicetos (EL-ZALAKI; HAMZA, 1979; KEKOS et al., 1987; SOUZA et al., 2008; JONATHAN; ADEOYO, 2011), como apresentado na Tabela 5.

2.6.2 Fonte de nitrogênio

Fungos não são capazes de fixar nitrogênio e, portanto, necessitam de suplementação deste elemento, seja de fontes orgânicas ou inorgânicas (MORETTI; SAROCCO, 2016). Algumas linhagens se desenvolvem melhor em meios contendo fontes orgânicas enquanto outras podem preferir fontes inorgânicas. Fontes orgânicas, como extrato de levedura, têm sido mais utilizadas na produção de amilases bacterianas (GUPTA et al., 2003). No entanto, a utilização destas fontes pode encarecer o meio de cultivo.

Como alternativa para a redução de custos no meio de cultivo, podem ser utilizadas fontes de nitrogênio inorgânicas, como a ureia. Para avaliar o efeito da fonte de nitrogênio na produção enzimática de diversas linhagens de macromicetos, Jonatan e Adeoyo (2011) utilizaram nitrato de sódio, peptona, extrato de levedura e ureia, e a maior atividade amilolítica foi obtida em meio contendo este último composto, por *Pleurotus tuber-regium*. Resíduos orgânicos de baixo custo também foram testados como fonte de nitrogênio por Naili et al. (2016) em substituição ao extrato de levedura no meio de cultivo de *Aspergillus oryzae*, obtendo resultados de atividade amilolítica superiores ao controle.

2.6.3 Razão C/N

A razão C/N é um parâmetro importante que deve ser observado no meio de cultivo, uma vez que afeta o crescimento micelial e síntese de metabólitos (WU et al., 2004). A razão C/N costuma ser o principal critério de escolha do substrato para produção de cogumelos em CS, utilizando-se proporções em torno 80:1 para produção de corpo de frutificação (GOUD; SURYAM, 2009). No entanto, esta razão deve ser avaliada de acordo com o metabólito de interesse. Para produção de exobiopolímeros em CSm, têm sido relatadas razões necessárias em torno de 20:1 (PARK et al., 2001). Na produção de biomassa de *Ganoderma lucidum*, Torres López et al., (2011) observaram a proporção adequada de 16,7:1. Dados sobre a influência desta razão na produção de enzimas de macromicetos não foram encontrados na literatura.

2.6.4 Fosfato e outros nutrientes

A suplementação de fosfato e magnésio influencia no crescimento e produção de metabólitos microbianos, uma vez que estes componentes participam de cadeias de transporte celulares de diversas espécies (HARDER; DIJKHUIZEN, 1983). Hsieh et al. (2006) relatam que reduzidas concentrações de fonte de fosfatos e magnésio ocasionaram baixo crescimento celular de *Ganoderma lucidum*.

A concentração de fosfato tem sido reportada como significativa para produção de amilases de diversas fontes microbianas (YO; YOON; CADMAN, 1989; KAMMOUN et al., 2008; RAMESH; MURTY, 2014). No cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens*, a alteração na concentração inicial de fosfato demonstrou maior efeito na produção de α -amilases do que a concentração inicial da fonte de carbono (YO, YOON & CADMAN, 1989). Para espécies fúngicas, melhores resultados na produção de amilases foram reportados em concentração inicial de 0,2M de fosfato (UENO et al. 1987; GUPTA et al., 2003)

A suplementação com fontes de Mg^{2+} demonstrou estimular a produção de amilases de *Aspergillus oryzae*, já presença de íons K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Cl^- no meio de cultivo não demonstrou efeito na produção de amilases para linhagens desta espécie (KUNDU et al., 1973). A α -amilase é uma metaloenzima, e a presença de Ca^+ como co-fator é considerada essencial para a sua atividade (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). No entanto, a presença deste íon no meio de cultivo para a produção de enzimas amilolíticas de *Aspergillus oryzae* já demonstrou ter efeito repressor (GUPTA et al., 2003).

A relação entre as concentrações de fosfatos e íons no meio de cultivo e a produção de amilase por macromicetos ainda não está esclarecida na literatura. Tais concentrações de íons e de fosfatos assim como de outros componentes nutricionais do meio devem ser ajustadas de acordo com o micro-organismo e o produto de interesse, uma vez que cada situação pode requerer condições ótimas diferentes (SALES-CAMPOS et al., 2011).

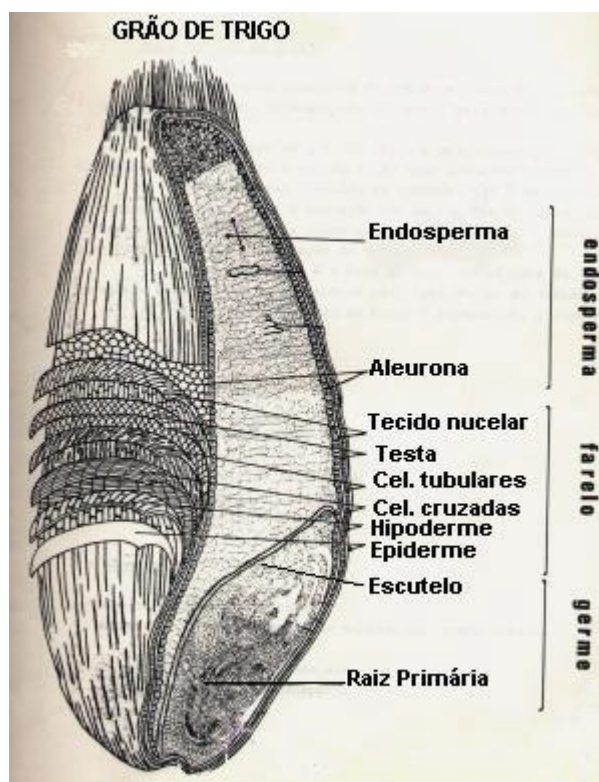
Como mencionado nos subitens 2.6.1 e 2.6.2, diversos resíduos agroindustriais podem ser utilizados para substituir fontes de carbono e de nitrogênio sintéticos de custo elevado. Mais do que isto, os meios formulados a partir de resíduos fornecem suplementação de diversos minerais e podem favorecer o crescimento microbiano e produção de enzimas. Dentre inúmeros resíduos produzidos durante o processamento de matérias-primas agrícolas, os derivados do trigo têm sido utilizados em diversos estudos pelo seu potencial de utilização em bioprocessos (PANESAR, 2016).

2.7 PROCESSAMENTO DE TRIGO: SUBPRODUTOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

O trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo. Na safra 2017/2018 foram produzidas 750 milhões de toneladas do grão (USDA, 2018a), do qual é derivada a farinha de trigo, que no ramo alimentício é empregada na produção de pães, bolos, massas e biscoitos. A farinha também é utilizada na produção de fármacos e cola, em menores proporções (MIRANDA; DE MORI; LORINI, 2010).

Do ponto de vista tecnológico, o grão de trigo pode ser dividido em três partes principais: o endosperma, o farelo e o gérmen (ou germe). O endosperma é constituído da parte amilácea e da camada de aleurona. O farelo é composto por pelo menos seis camadas distintas e o germe inclui o escutelo e embrião (raiz primária) (NEVES et al, 2006b; MIRANDA, 2006).

FIGURA 3 - DIVISÃO ESTRUTURAL DO GRÃO DE TRIGO



FONTE: O MUNDO DO TRIGO (2015)

Durante o processamento, estas três partes são separadas, e quando recombinadas dão origem a diferentes tipos de farinhas (NEVES et al., 2006b). As farinhas primárias são obtidas do endosperma amiláceo puro (parte mais interna do endosperma), o que corresponde a cerca de 65% do volume de trigo processado. O restante do grão dá origem a diversos subprodutos, como a farinha de cauda, o germe e os farelos (fino e grosso) (DELCOUR; HOSENEY, 2010).

A farinha de cauda é uma farinha de baixo grau de purificação, que é constituída pelo endosperma, camadas de sub-aleurona e aleurona, e até por uma fração de farelo. Em alguns casos ela pode ser facilmente misturada às farinhas primárias para formulação de farinhas destinadas a alguns tipos específicos de produtos. No entanto, a composição de fibras, cinzas e o teor de amido danificado neste tipo de farinha pode interferir no processo fermentativo e acarretar a redução do volume de pães, como reportado por Hemdane et al. (2015). Quando separada das demais farinhas, passa a ser considerada um subproduto de fração representativa no processamento, correspondendo a 7-10% do volume total processado. O germe e os farelos correspondem a 25% do total (DELCOUR; HOSENEY, 2010).

Em decorrência das diferentes partes do grão dos quais são formados, os diferentes tipos de subprodutos originados da moagem do trigo apresentam composição centesimal variada. Na Tabela 6 são apresentadas as composições de proteínas, amido ou carboidratos

totais, cinzas e de alguns minerais reportados para a farinha de cauda, o farelo e a farinha de trigo comum. Estas frações corresponderiam às fontes de carbono, nitrogênio e minerais/íons importantes para o crescimento e produção de metabólitos microbianos.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DE CAUDA, FARELO DE TRIGO E FARINHA DE TRIGO COMUM REPORTADAS NA LITERATURA

COMPOSIÇÃO (PORÇÃO DE 100g)	FARINHA DE CAUDA	FARELO	FARINHA (BRANCA, COMUM)
Carboidratos Totais (g)	63,5	57,5 - 64,65	75,1 - 76,31
Amido (g)	54,4	22	NR
Proteínas (g)	18,8	15,55 - 18,9	9,8 - 10,33
Cinzas (g)	2,8	6,4	0,8
Cálcio (mg)	NR	73	15 - 18
Fósforo (mg)	NR	1013	108 - 115
Magnésio (mg)	NR	611	28 - 31
Potássio (mg)	NR	1182	107 - 151
Sódio (mg)	NR	2	1 - 2

FONTES: USDA (2018b; 2018c); Hemdane et al. (2015); TACO (2011).

*NR: Não Reportado

A rica composição deste tipo de substrato favorece sua utilização em bioprocessos. O farelo de trigo, por exemplo, já foi utilizado em estudos para produção de amilases de macromicetos (EL-ZALAKI; HAMZA, 1979; KEKOS et al., 1987, ZILLY et al., 2012), e existem diversos exemplos de estudos que o tenham utilizado na produção de amilases e de outras enzimas por outras espécies fúngicas e bacterianas. Outros subprodutos do trigo são explorados em menor escala. Dentre os poucos estudos reportados, Kammoun et al. (2008) utilizaram um subproduto semelhante à farinha de cauda para produção de amilases de *Aspergillus* sp. A produção de amilases de macromicetos a partir de substratos como este, no entanto, ainda não foi avaliada.

2.8 ESTUDO CINÉTICO E OTIMIZAÇÃO DE BIOPROCESSOS

O estudo cinético de um bioprocessos consiste em avaliar a concentração de um ou mais componentes do sistema (biomassa, substrato e produto) ao longo do tempo de cultivo ou fermentação (HISS, 2001). A partir de então, alguns parâmetros importantes podem ser determinados: fatores de conversão Y (de substrato em biomassa, $Y_{X/S}$; substrato em produto,

$Y_{P/S}$; e de biomassa em produto, $Y_{P/X}$), velocidades instantâneas e velocidades específicas μ (de consumo de substrato, μ_s ; de crescimento celular, μ_x ; e de formação de produto, μ_p), velocidade máxima específica de crescimento microbiano (μ_{max}), tempo de duplicação ou tempo de geração (t_d), produtividade em produto (γ).

A otimização de um bioprocesso consiste em determinar as condições nas quais os fatores de conversão ou a produtividade são maximizados. Na literatura, diversas ferramentas estatísticas e de planejamento experimental são utilizadas para esse fim. A definição da estratégia de otimização utilizando planejamentos experimentais depende do número de variáveis independentes a serem estudadas. Métodos clássicos envolvem a variação de um parâmetro, mantendo os outros a um nível constante, denominados *OVAT* (“*One-variable-at-time*” ou “uma variável por vez”) (BAŞ et al., 2007; KAMMOUN et al., 2008; MOREIRA et al., 2014).

Em bioprocessos, como a(s) variável(is) resposta(s) pode(m) ser influenciada(s) por uma série de variáveis de entrada, do método *OVAT* torna-se deficiente, devido ao grande número de experimentos necessários e à impossibilidade de verificar a interação entre os fatores (BAŞ et al., 2007; KAMMOUN et al., 2008; MOREIRA et al., 2014). O procedimento de planejamento experimental deve levar em consideração todas as variáveis independentes. No caso de muitas variáveis, costuma-se utilizar planejamentos fracionados ou do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) para selecionar variáveis de maior efeito sobre as respostas desejadas. Em seguida, utiliza-se um outro planejamento com três variáveis significativas demonstradas no planejamento inicial (*Screening Design*) para obter a maximização da(s) variável(is) resposta(s) (COLLA, 2008; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Segundo Naili et al (2016), entender o efeito associado de todos os fatores e parâmetros nas condições experimentais para produção de enzimas é essencial no processo de cultivo submerso. Nesse aspecto, o delineamento composto central rotacional (DCCR), conhecido como metodologia de superfície de resposta, torna-se adequado, uma vez que permite avaliar a influência combinada dos fatores de entrada na otimização da resposta desejada.

2.9 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Após o término do cultivo ou processo fermentativo, iniciam-se as etapas conhecidas como *downstream*, para recuperação e purificação da enzima de interesse.

Para recuperação de enzimas extracelulares produzidas por cultivo submerso, a primeira etapa consiste na clarificação e separação das células microbianas, obtendo-se o

extrato enzimático bruto. A partir do extrato enzimático, iniciam-se as etapas de purificação da enzima. Os processos de separação de proteínas são baseados na solubilidade, no tamanho e na carga das moléculas, além da interação específica de cada molécula com materiais diversos, o que possibilita o desenvolvimento de técnicas de separação cada vez mais precisas. Os principais processos de recuperação de enzimas assim como o princípio de cada técnica são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 – TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Etapas do processo	Técnica de Separação	Princípio
Clarificação	Filtração comum	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Filtração por membrana	Tamanho de partículas
	Flotação	Hidrofobicidade de partículas
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas
	Extração em sistemas de duas fases aquosas	Solubilidade, massa molar
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão celular	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
	Membranas adsortivas	Massa molar

FONTE: PESSOA E KILIKIAN (2005); PADILHA (2010)

As etapas de purificação de enzimas podem ser divididas em purificação de alta e baixa resolução, de acordo com o grau de purificação que proporcionam. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração propiciam alta concentração, mas baixa purificação,

A precipitação é bastante difundida e aplicada na purificação de enzimas. Consiste em uma etapa inicial, cujo objetivo principal é reduzir o volume de extrato enzimático para etapas subsequentes. A adição de sais como NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em concentrações elevadas, técnica conhecida como *salting-out*, aumenta a força iônica de forma que as moléculas proteicas se agregam e se precipitam. A proteína precipitada pode ser então separada por meio de centrifugação.

A técnica de ultrafiltração pode ser utilizada para dessalinização e para concentração do extrato enzimático, seja no início, no fim ou entre diferentes etapas de purificação. A concentração é obtida pela remoção do soluto através de uma membrana semipermeável, na qual a enzima de interesse fica retida. A passagem da água e de pequenas moléculas através da membrana pode ser exercida por pressão ou centrifugação. Em nível laboratorial, podem ser empregadas unidades de ultrafiltração de centrífuga, mas o volume recuperado é muito pequeno. Para maiores escalas, existem diversos sistemas de ultrafiltração adaptados com sistemas de bombeamento.

Geralmente, a obtenção de um produto final envolve a combinação de diferentes técnicas de purificação de enzimas. A escolha da técnica a ser empregada depende principalmente do grau de purificação necessário para a aplicação de interesse. Graus de purificação mais elevados implicam maiores custos de obtenção e maiores perdas de atividade enzimática. Para aplicação na indústria, como na indústria de alimentos, a produção de enzimas se dá em grandes escalas e a pureza é considerada secundária. Aplicações terapêuticas, por outro lado, demandam graus de purificação mais elevados. Apenas purificações de baixa resolução podem ser empregadas em alguns casos, desde que possíveis impurezas presentes no extrato não interfiram na reação catalisada, ou no produto de interesse.

2.10 PATENTES RELACIONADAS AOS OBJETOS DE INOVAÇÃO DO TRABALHO

Consultas às bases de patentes *Espacenet*, que possui em seu acervo documentos de mais de 90 países, e do INPI (*Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Brasil*) foram realizadas para verificar o depósito de patentes relacionadas à produção de enzimas amilolíticas por microrganismos e à aplicação de subprodutos de moagem de trigo na produção de amilases.

Na base de patentes brasileira, a busca pelo termo “amilases” gera 105 resultados relacionados à produção e aplicação destas enzimas. Nenhum deles, no entanto, relata a produção destas enzimas por alguma espécie de microrganismo.

Em consulta à base de patentes *Espacenet Patent Search*, a inserção do termo “*amylase*” separadamente gera mais de 1000 resultados. Na busca combinada dos termos “*mushroom amylase*” e “*fungus amylase*” e “*basidiomycetes amylase*” foram localizadas 4 patentes relatando a produção ou utilização destas enzimas tendo como fonte espécies de microrganismos, apresentadas na Tabela 8.

As patentes relacionadas à produção de amilases de microrganismos são escassas, exploram apenas algumas espécies e nenhuma delas relata a produção destas enzimas por cultivo submerso. Das patentes relacionadas à produção de amilases de microrganismos apresentadas na Tabela 8, a primeira e a terceira relatam a extração da enzima do meio de cultivo para produção de corpos de frutificação de microrganismos. A segunda protege a aplicação de α -amilase e glucoamilase provenientes de basidiomycetes, sem detalhar, no entanto, o processo de produção ou extração destas enzimas. Já a última relata efetivamente a produção de amilases, assim como de outras enzimas, por *Pycnoporus sanguineus* por cultivo sólido (CS).

Para verificar a existência de depósitos relacionados à utilização de subprodutos de moagem do trigo na produção de amilases microbianas, a busca no INPI combinou os termos “trigo”, “subprodutos”, “farelo de trigo”, “enzimas” e “amilases”. No *Espacenet* os mesmos termos, traduzidos em inglês, foram combinados. Ao final, foram encontrados 6 resultados relacionados à produção de amilases a partir de resíduos de moagem do trigo, apresentadas na Tabela 8.

Três das patentes listadas (JP19960145531 19960607; KR20010078494 20011212; TW20110109689 20110322) detalham o processo de produção de amilases em CS utilizando farelo de trigo. Estas patentes diferenciam-se quanto à espécie microbiana utilizada, à suplementação e a alguns parâmetros de processo para produção das enzimas em CS. A patente brasileira de número BR1020140315918 A2 detalha, além do processo de produção utilizando farelo de trigo em CS, a aplicação das amilases obtidas para produção de xarope de glicose. Apenas uma das patentes listadas na Tabela 9 detalha produção de enzimas do complexo celulolítico/amilolítico em CSm utilizando, além do farelo de trigo, amido e polpa de beterraba como fontes de carbono.

A patente brasileira BR 10 2012 002376 8 A2 foi incluída na Tabela 9 apesar de não tratar da produção de amilases. Esta patente relata o CS utilizando farelo de trigo para produção de lacases e peroxidases de uma linhagem de microrganismo (*Agaricus blazei*).

Observa-se que ainda há uma quantidade pequena de patentes que utilizem subprodutos de trigo para produção de amilases e que apenas a utilização do farelo de trigo foi

mencionada até então. As espécies protegidas nos processos relatados para produção de amilases são espécies fúngicas, mas a utilização de espécies de macromicetos está relacionada apenas à produção de lacases e peroxidases.

As patentes relatadas nas Tabelas 8 e 9, assim como os estudos apresentados na Tabela 2 demonstram que há uma lacuna na produção científica relacionada à produção de amilases fúngicas. Apesar de a espécie *Coprinus comatus* ter sido utilizada para produção de amilases em estudo anterior, a associação do cultivo submerso desta espécie com a utilização de resíduos ainda não foi avaliada. A associação de CSm, em geral, com a utilização de resíduos agroindustriais é sugerida em uma pequena quantidade de estudos, e a avaliação do potencial biotecnológico de subprodutos do trigo além do farelo é pouco relatada. O presente estudo pretende preencher esta lacuna ao utilizar resíduos de moagem do trigo para produção de amilases de *C. comatus* em cultivo submerso.

TABELA 8 - PATENTES RELACIONADAS À PRODUÇÃO DE AMILASES DE MACROMICETOS

Nº. da patente	Título da patente	Enzima	Macromiceto	Observações	País	Ano
US4458017 (A)	Process for preparing fructose from starch	α -amilase e glucoamilase	<i>Stereum striatum</i> , <i>Perenniporia compacta</i> , <i>Sebacina colcea</i> e <i>Irpex mollis</i>	Processo de sacarificação e liquefação do amido utilizando α -amilase e glucoamilase produzidas por basidiomicetos.	EUA	1982
CS198800038 39 19880603	Fungal Alpha-amylase	α -amilase	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Produzir amilase sacarogênica derivada de um meio de cogumelo	China	1990
KR201301343 51	Method for producing saccharogenic amylases from spent mushroom substrates	α -amilase	<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Filammulina velutipes</i> , <i>Lentinus edodes</i>	Extração da enzima com solvente a partir do meio de cultivo de cogumelos.	Coreia	2013
WO2016MY0 0056 20160826	White-rot basidiomycete- <i>Pycnoporus sanguineus</i> (ganobf2) for production of lignocellulolytic enzymes using lignocellulosic agro wastes	Aamilases	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Produção de amilases e enzimas lignocelulolíticas por cultivo sólido de <i>Pycnoporus sanguineus</i> utilizando resíduos agroindustriais.	Malásia	2016

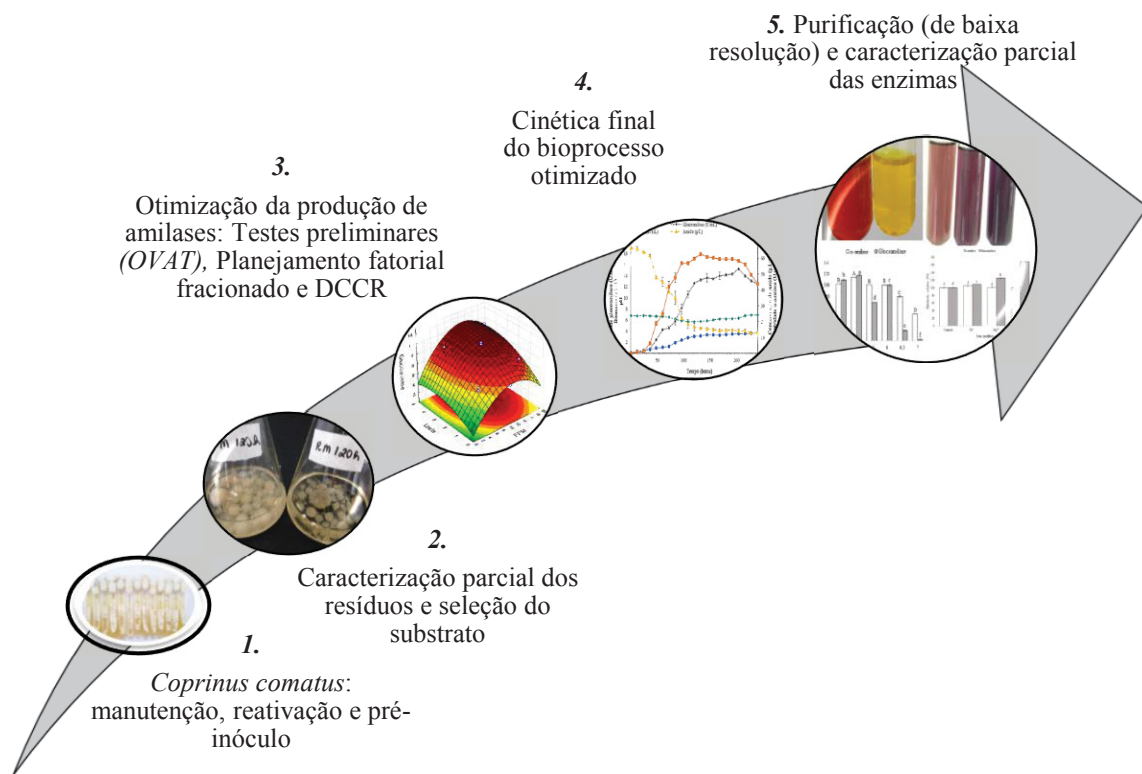
TABELA 9 - PATENTES RELACIONADAS À UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE TRIGO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES

Nº da patente	Título da Patente	Enzima (s)	Micro-organismo (s)	Observação	País	Ano
JP1996014553 1 19960607	Medium for producing amylase	Amilases	<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 30113 <i>Rhizopus delemar</i> IFO 480	CS em meio contendo farelo de trigo	Japão	1997
KR200100784 94 20011212	Method for producing crude enzymes, including glucoamylase as main enzyme to manufacture grain spirit	Amilases	<i>Aspergillus usamii</i>	CS utilizando farelo de trigo	Coreia do Sul	2005
MD20100000 101 20100916	Process for the production of cellulase-amylase complex	Celulases/ Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	CSm em meio contendo polpa de beterraba, amido e farelo de trigo como fontes de carbono	Moldavia	2010
TW20110109 689 20110322	Culture formulation using <i>Aspergillus</i> to increase amylase yield after solid state fermentation of grain/bean	Amilases	<i>Aspergillus</i> spp.	CS em 65% de farelo de trigo, 25% de pó de soja e 10% de feijão mungo	Taiwan	2011
BR 10 2012 002376 8 A2	Processo de produção e uso de lacases e/ou peroxidases obtidas a partir de <i>Agaricus blazei</i>	Lacases e peroxidases	<i>Agaricus blazei</i>	CS utilizando farelo de trigo	Brasil	2012
BR 10 2014 031591 8 A2	Processo para obtenção de xarope de glicose via hidrólise por extrato amilolítico	Amilases	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	CS utilizando farelo de trigo	Brasil	2014

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos referentes ao presente estudo foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (LENGBIO), no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) e no Laboratório de Catálise e Processos Químicos (LCPQ) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná. As principais etapas do trabalho estão representadas na Figura 4.

FIGURA 4 – PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS NO ESTUDO



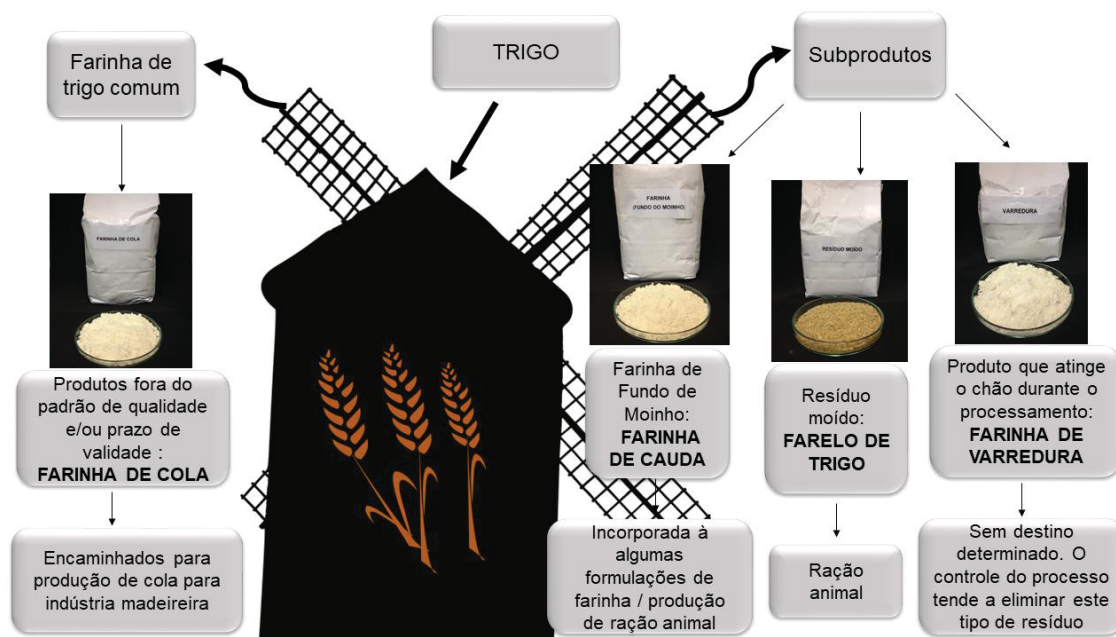
FONTE: A autora (2018)

3.1 SUBPRODUTOS DE MOAGEM DO TRIGO

Para o presente estudo, quatro amostras consideradas subprodutos de um moinho de Curitiba – PR foram avaliadas para produção de amilase de *Coprinus comatus*. Além da farinha de cauda (aqui denominada farinha de fundo de moinho, FFM) e do farelo de trigo (FT), as amostras adquiridas incluíam a farinha de cola (FC) e a farinha de varredura do moinho (FV). A origem e o destino final de cada um destes subprodutos são representados na Figura 5. Os resíduos foram caracterizados quanto ao teor de umidade, proteínas, cinzas (AOAC, 2005) e

amido (AOAC 996.11, 1995). A quantificação de minerais (Cálcio, Fósforo, Magnésio, Potássio e Sódio) foi realizada de acordo com metodologia AOAC 999.10 (2005).

FIGURA 5 - SUBPRODUTOS DE PROCESSAMENTO DO TRIGO: FARINHA DE COLA (FC), FARINHA DE FUNDO DE MOINHO (FFM), FARELO DE TRIGO (FT) E FARINHA DE VARREDURA (FV). ORIGEM E DESTINO FINAL.



FONTE: A autora (2018)

3.2 CEPA DE MACROMICETO E INÓCULO

A cepa *Coprinus comatus*, proveniente do Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO – PR), foi mantida em meio Ágar Potato Dextrose (PDA, Neogen®, USA) pH 6,0, previamente esterilizado em autoclave (121°C/15 min) e inclinado. A cepa foi armazenada em temperatura ambiente por até 3 meses. Para reativação, fragmentos de micélio dos tubos inclinados foram repicados em superfície de mesmo meio estéril em placas de Petri, e incubadas novamente a 28°C ± 2°C por 7 dias.

O pré-inóculo foi preparado inicialmente em meio Czapek constituído de (g.L⁻¹) 30 de sacarose (Neon®, Brasil), 2 NaNO₃ (Dinâmica®, Brasil), 1 K₂HPO₄ (Alphatec®, Brasil), 0.5 MgSO₄.7H₂O (Alphatec®, Brasil), 0.5 KCl (Synth®, Brasil), 0.01 FeSO₄.7H₂O (Vetec®, Brasil), pH 6,0. Após ensaios preliminares, verificou-se a maior adaptação da linhagem e maior produção de biomassa em meio líquido que continha a Farinha de Fundo de Moinho. Portanto, o pré-inóculo foi preparado em meio formulado a partir do próprio resíduo, em uma

concentração de 5 g.L⁻¹. Frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de cada meio foram esterilizados em autoclave (121°C/15min). Em seguida foram inoculados com 5 fragmentos de micélio (5mm de diâmetro) e incubados em shaker rotativo (TE-421, Tecnal®, Brasil, 28°C - 120 rpm). Para os ensaios experimentais, a biomassa do pré-inóculo foi drenada com auxílio de peneira de aço inoxidável estéril (SALMON, 2011) e utilizada para inocular os frascos-teste na proporção de 0,5% (m/v).

3.3 SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES

Para verificar a produção de amilases nos resíduos descritos no subitem 3.1 e avaliar se algum dos resíduos seria mais favorável para produção de amilases de *C. comatus*, foram formulados meios contendo 10 g.L⁻¹ de cada resíduo, sem qualquer tipo de suplementação. 100 mL de cada meio foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL e esterilizados em autoclave. O pré-inóculo em meio Czapek foi drenado e inoculado conforme descrição anterior (item 3.2).

Amostras do cultivo foram retiradas a cada 24h durante 7 dias para determinação das atividades enzimáticas (α -amilase e glucoamilase, subitens 3.7.1 e 3.7.2).

3.4 TESTES PRELIMINARES DE SUPLEMENTAÇÃO E pH INICIAL DO MEIO DE CULTIVO

Tendo em vista que diversos estudos utilizam a suplementação dos resíduos e otimização das condições de cultivo como forma de obter maiores resultados, optou-se por avaliar o efeito de suplementações do meio de cultivo. Após seleção de um dos resíduos (FFM), fontes de carbono suplementares (glicose, maltose e sacarose), fontes de nitrogênio (extrato de levedura, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ e ureia) e sais (K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂ e FeSO₄.7H₂O) foram adicionados individualmente (OVAT) ao meio de cultivo contendo 10 g.L⁻¹ de FFM, para avaliar sua influência na produção de amilases. As fontes de carbono foram padronizadas em unidades de hexoses equivalentes, para uma proporção inicial de 10 g.L⁻¹ de glicose. As fontes de nitrogênio escolhidas foram adicionadas em mesma proporção de nitrogênio (considerando um inicial de 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura contendo 11,8% de nitrogênio total), e os sais foram testados em concentrações de 0,1 M. Nesta etapa, a influência do ajuste de pH inicial do meio de cultivo (pHs 5,0, 6,0 e 7,0) também foi avaliada. As atividades enzimáticas de α -amilase e

glucoamilase nos frascos-teste foram determinadas em 120h de cultivo, tempo de obtenção de máxima atividade enzimática durante a seleção do substrato.

3.5 OTIMIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTIVO

3.5.1 Planejamento fatorial fracionado

Os resultados dos testes preliminares indicaram que a adição de ureia, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ e $CaCl_2$ induziu a produção de amilases de *C. comatus*. Diante disso, um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} (com 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios) foi aplicado para avaliar o efeito da concentração de FFM, ureia, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ e $CaCl_2$ como componentes do meio de cultivo na produção de amilases de *C. comatus*. Cada variável foi estudada em 3 níveis (-1, 0 e +1, Tabela 10). Os níveis escolhidos para ureia, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ e $CaCl_2$ foram baseados em concentrações utilizadas anteriormente em meio sintético (PALUDO et al., 2018) e para os testes de suplementação. O nível máximo (+1) para a FFM foi fixado em 35 g.L^{-1} devido à alta viscosidade adquirida pelo meio após autoclavagem quando utilizadas concentrações superiores.

TABELA 10 - NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO FRACIONADO 2^{5-1} PARA OTIMIZAR A PRODUÇÃO DE AMILASES POR *C. comatus* EM CSm. X1= FFM; X2= Ureia; X3= K_2HPO_4 ; X4= $MgSO_4$ e X5= $CaCl_2$.

Variável		-1	0	+1
FFM (g.L^{-1})	X1	5	20	35
Ureia (g.L^{-1})	X2	0,3	0,8	1,3
K_2HPO_4 (g.L^{-1})	X3	0,3	1,05	1,8
$MgSO_4$ (g.L^{-1})	X4	0,3	0,75	1,2
$CaCl_2$ (g.L^{-1})	X5	0,3	0,75	1,2

3.5.2 Delineamento Composto Central Rotacional

As variáveis com efeito significativo ($p \leq 0,05$) no planejamento fatorial fracionado foram otimizadas por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três replicatas no ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios. As variáveis estudadas e os valores reais e codificados são apresentados na Tabela 11.

Para atingir a otimização no DCCR e baseando-se em experimentos preliminares, a faixa de concentração de FFM, ureia e K_2HPO_4 foi ampliada. Tendo em vista as altas concentrações (Tabela 11) e para evitar viscosidade excessiva do meio de cultivo, a FFM foi

autoclavada separadamente dos demais componentes do meio de cultivo, já diluídos em água. As faixas de estudo para ureia e K_2HPO_4 também foram ampliadas, (nível -1 próximo às quantidades máximas estudadas no planejamento fatorial e nível -1,68 mantido em 0, considerando possível interação com as altas concentrações de substrato).

TABELA 11 - NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (CONCENTRAÇÃO DE FFM, UREIA E K_2HPO_4) UTILIZADOS NO DCCR

Variáveis independentes	Valores reais e codificados				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
FFM (g.L ⁻¹)	10	48,5	105,0	161,5	200,0
Ureia (g.L ⁻¹)	0.00	1	2,5	4	5
K_2HPO_4 (g.L ⁻¹)	0.00	2	5	8	10

A produção de amilases foi conduzida em cultivo submerso em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultivo, em pH 6,0 em shaker rotativo (TE-421, Tecnal®, Brasil) a 28°C e 120 rpm. Após 120 horas de cultivo foram retiradas amostras para a dosagem de atividade de α -amilase e glucoamilase (subitens 3.7.1 e 3.7.2).

Os planejamentos experimentais foram desenvolvidos e analisados utilizando-se Statistica Software® 7.0, para Windows (Statsoft®, Estados Unidos). Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória, tendo como respostas as atividades de α -amilase e glucoamilase. O ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expresso pelo coeficiente de determinação R^2 , e a significância estatística foi determinada pelo teste F (análise de variância - ANOVA).

O modelo matemático obtido foi validado externamente pela realização de experimentos utilizando os valores ótimos das variáveis preditos pela superfície de resposta. O índice de desejabilidade, também obtido pelo Statistica Software®, foi aplicado a fim de encontrar a condição ótima do processo para ambas as respostas (atividades de α -amilase e glucoamilase).

3.6 CINÉTICA FINAL DO BIOPROCESSO OTIMIZADO

A partir da definição das condições ideais para a produção das enzimas, foi realizada uma cinética final utilizando-se meio otimizado com duração de 240 h (10 dias). Os testes foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 ml incubados a 28°C sob 120 rpm de agitação orbital. Amostras foram coletadas a cada 12 h e analisadas quanto às atividades enzimáticas de

α -amilase e glucoamilase (subitens 3.7.1 e 3.7.2), quantidade de substrato (quantificado em amido, subitem 3.7.3), biomassa (subitem 3.7.4) e pH (subitem 3.7.5).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Determinação de atividade α -amilase

A atividade de α -amilase (atividade sacarificante) foi determinada pelo método iodo-iodeto, modificado de Xiao (2006) e Fuwa (1954), com base no decréscimo da coloração azul característica do complexo amido-iodo. Para isso, 250 μ L de uma solução de amido 1% em tampão acetato de sódio 0,1M (pH 6,0) e 250 μ L do extrato enzimático bruto (EEB) propriamente diluído no mesmo tampão foram adicionados em tubos de ensaio e mantidos em banho-maria a 50°C por 15 min. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 500 μ L de ácido acético 2M. Foram adicionados 20 mL de água, seguidos de 500 μ L de uma solução de iodo-iodeto (0.2 % m/v iodo, 2 % w/v iodeto de potássio e água destilada). O branco do substrato foi realizado da mesma forma, sem adição de EEB, e no branco das amostras não houve adição da solução de amido. As amostras foram em seguida lidas em espectrofotômetro a 700 nm (Modelo UV-6100PC DOUBLE BEAM, Shangai, CHN). A atividade de α -amilase foi expressa em unidades internacionais (U). Uma unidade (U) representa a quantidade de enzima capaz de converter 0,1 mg de substrato (amido solúvel) por minuto de reação, nas condições de ensaio. As determinações foram realizadas em triplicata.

3.7.2 Determinação de atividade de glucoamilase

Uma vez que a glucoamilase libera moléculas de glicose, a atividade desta enzima foi determinada pela liberação de açúcares redutores, através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959). As mesmas proporções de solução de amido e EEB descritas no subitem 3.7.1 compuseram o meio reacional incubado em banho-maria à 50°C por 15 minutos. O branco do substrato foi realizado da mesma forma, sem adição de EEB, e no branco das amostras não houve adição da solução de amido. A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de solução de DNS. Em seguida, a mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos, resfriada em banho de gelo e diluída em 4 mL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade de glucoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto, seguindo a curva padrão de glicose construída previamente.

3.7.3 Quantificação de amido

A quantificação de amido nas amostras de cultivo foi realizada por meio de hidrólise enzimática, seguindo metodologia adaptada da AOAC (996.11, 1995). Amostras do cultivo foram retiradas a cada 12h e mantidas em banho em ebulição por 10 min para inativação das amilases. Dois mL de amostra foram transferidos para tubo de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 8 mL de etanol 95% v/v, a fim de extrair glicose e dextrinas presentes na amostra. Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foram centrifugados (centrífuga Centribio[®], Brasil) a 1000g/15 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet retido foi diluído em 1 mL de água. As amostras foram então hidrolisadas com α -amilase (Spring Alfa, Granotec[®], Brasil) na concentração de 100 U.mL⁻¹, diluída em tampão acetato 0,1M, pH 5,5 + 1mM CaCl₂ e glucoamilase (Spring AG, Granotec[®]) Brasil, na concentração de 330 U.mL⁻¹, diluída em tampão acetato 0,1 M, pH 4,5. A glicose produzida pela hidrólise do amido remanescente foi medida colorimetricamente ($\lambda = 505\text{nm}$) utilizando reagente glicose oxidase/peroxidase (Bioliq Glicose, Laborclin[®], Brasil). O conteúdo de amido das amostras foi calculado conforme equação 1 e apresentado em g.L⁻¹ de meio de cultivo.

$$\text{Amido (g.L}^{-1}\text{)} = \Delta A \times F \times 0,01 \times 0,9 \times 5,5 \times D \quad (1)$$

Em que:

- ΔA = Absorbância da amostra contendo glicose – Absorbância do reagente;
- $F = \frac{100 (\mu\text{g de D-glicose})}{\text{Absorbância de } 100 \mu\text{g de glicose (padrão)}} = \text{Fator de conversão (absorbância para } \mu\text{g de glicose)}$
- 0,01 = Fator para converter μg de glicose em 0,01 mL (utilizados para quantificação) para g de glicose por L de amostra.
- $0,9 = \frac{162}{180}$ = conversão de D-glicose livre para anidro-D-glicose (que ocorre no amido).
- 5,5 = Diluição das amostras com as soluções de α -amilase e glucoamilase utilizadas na hidrólise.
- D = diluições posteriores para quantificação da glicose hidrolisada.

3.7.4 Determinação da Biomassa

A biomassa foi determinada por método termogravimétrico. O cultivo líquido foi filtrado em funil de porcelana com papel filtro (Whatman nº 1), kitassato e bomba a vácuo (Suctron Eletronic, Schuster®, BR). O papel filtro contendo a biomassa retida após filtração foi seco a 105°C até peso constante. A biomassa (em g.L⁻¹) foi calculada conforme equação (2).

$$X_s = \frac{(m_2 - m_1)}{V} \quad (2)$$

Em que:

- X_s = biomassa seca (g L⁻¹);
- m_2 = massa do filtro com a biomassa seca (g);
- m_1 = massa do filtro seco (g);
- V = volume de cultivo filtrado (L).

3.7.5 Determinação do pH

A determinação do pH ao longo do processo foi realizada por meio da medida direta do caldo fermentado em pHmetro (Luca®, Brasil).

3.7.6 Determinação de proteínas e atividade específica

Os teores proteicos nas preparações enzimáticas de amilases foram determinados conforme descrito por Bradford (1976). A mistura de reação contendo 50 µL de amostra e 1500 µL do reagente de Bradford foi mantida em repouso por 5 min a temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm e a concentração de proteínas foi obtida a partir de curva padrão (com 0 – 10 µg de albumina sérica bovina - BSA).

3.8 PARÂMETROS DO BIOPROCESSO

Os parâmetros velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempo de duplicação (t_d) foram calculados a partir dos dados experimentais (equações 3 e 4) durante a fase logarítmica do crescimento e produção das enzimas (de 36 a 120h). A produtividade

horária total de biomassa e de produto foram calculados a partir dos dados experimentais (equações 5 e 6). A produtividade máxima em produto ($\gamma_{p\text{máx}}$) corresponde ao maior valor de obtido, calculando-se a produtividade em cada ponto experimental.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i} \quad (3)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (4)$$

$$\gamma_{x\text{ total}} = \frac{X_f - X_i}{t_t} \quad (5)$$

$$\gamma_{p\text{ total}} = \frac{P_f - P_i}{t_t} \quad (6)$$

Em que:

- t_d = tempo de duplicação (h);
- $\mu_{\text{máx}}$ = velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1});
- t_i e t_f = tempo inicial e final (h);
- X_i e X_f = Concentração inicial e final de biomassa (g L^{-1});
- $\gamma_{x\text{ total}}$ = rendimento total de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);
- t_t = tempo total de cultivo (h);
- $\gamma_{p\text{ total}}$ = rendimento total em produto (α - amilase e glucoamilase) ($\text{U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);
- P_i e P_f = concentração inicial e final de produto (g.L^{-1});

3.9 FATORES DE CONVERSÃO

Os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), substrato em produto ($Y_{P/S}$) e biomassa em produto ($Y_{P/X}$) foram calculados em um período de 168h de cultivo (equações 6 – 8).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (6) \quad Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (7) \quad Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{P_f - P_i}{X_f - X_i} \quad (8)$$

Em que:

- X_i = Concentração inicial de biomassa (g.L^{-1});
- X_f = concentração final de biomassa (g.L^{-1});
- P_i = Concentração inicial de produto (U.mL^{-1});
- P_f = concentração final de produto (U.mL^{-1});
- S_i = concentração inicial de substrato (g.L^{-1});

- S_f = Concentração final de substrato (g.L^{-1}).

3.10 PURIFICAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO ENZIMÁTICO

As amilases produzidas foram purificadas parcialmente (purificação de baixa resolução) a partir do extrato enzimático bruto obtido do meio otimizado com 136h de cultivo. Para tanto, 30 mL do caldo fermentado foram centrifugados e em seguida filtrados (membrana de *nyllon* 0,22 μm , Analítica[®], Brasil) para separação da biomassa e de substrato insolúvel remanescente. Posteriormente adicionou-se sulfato de amônio (Prolab[®], Brasil) gradativamente até concentração final de 80% de saturação. A etapa de dessalinização e concentração foi realizada por meio de ultrafiltração utilizando unidades de ultrafiltração de centrífuga (*cut-off* - 10 kDa, Vivaspin 6, GE[®], Reino Unido). Três mL da amostra clarificada e dessalinizada foi centrifugada (4000 g, Hermle[®] Z326K, Alemanha) durante 30 minutos a 4°C e concentrada. O extrato enzimático concentrado foi empregado nos testes de efeito da temperatura, pH e íons metálicos.

3.10.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade de α -amilase e glucoamilase

Para avaliar o efeito do pH nas atividades de α -amilase e glucoamilase, foram utilizados tampões acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5, 5,0; 5,5 e 6,0) e fosfato de sódio 0,1 M (pH, 6,5 e 7,0). As condições de tempo e temperatura dos ensaios enzimáticos foram as mesmas utilizadas no ensaio padrão descrito anteriormente. O efeito da temperatura na atividade amilolítica foi determinado em seguida utilizando pH e tempo de reação padrão do ensaio enzimático (subitens 3.7.1 e 3.7.2) nas temperaturas de 40 e 60°C, além da temperatura padrão de 50°C. A atividade relativa (%) foi expressa como a razão entre a atividade enzimática obtida nos respectivos pH e temperatura e a atividade obtida nas condições padrão.

3.10.2 Efeito de íons metálicos na atividade de amilases

O efeito dos íons metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}) na atividade de α -amilase e glucoamilase foi avaliado empregando tampão acetato 0,1 M, pH 5,0. Os íons foram adicionados ao tampão utilizado na reação enzimática em concentração final de 5 mM, sob a

forma de cloreto de cálcio (Prolab[®], Brasil) e sulfatos de magnésio e manganês (Synth[®], Brasil). A atividade sem adição dos íons metálicos foi considerada como 100%.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Replicatas foram realizadas para cada experimento e os resultados foram expressos como média \pm dp (desvio-padrão). Os dados foram analisados de acordo com a análise de variância (ANOVA). A homogeneidade dos grupos foi identificada e a diferença entre médias foi realizada por meio do teste de Tukey em um nível de 95 % de confiança ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software Statistica[®] 7.0, para Windows (Statsoft[®], Estados Unidos).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS SUBPRODUTOS DE MOAGEM DO TRIGO

Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos na caracterização parcial dos subprodutos de trigo quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas, amido, além do perfil de alguns minerais presentes nestes resíduos.

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS (FT, FFM, FC e FV) DE SUBPRODUTOS DE TRIGO UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE AMILASES

Composição (%) (m/m)						Perfil de Minerais (mg/100g de amostra)				
Resíduo*	Umidade	Cinzas	Proteínas**	Amido	Relação C/N ***	Ca	P	Mg	K	Na
FT	12,98	5,02	15,8	43,95	8,27	122,002	379,499	153,603	727,387	31,885
FFM	13,24	2,68	18,02	63,91	10,72	64,593	760,136	272,259	816,837	34,708
FC	13,24	0,85	15,18	78,98	15,53	35,137	149,135	43,331	182,241	27,416
FV	13,48	1,36	14,57	81,07	16,68	50,751	156,794	46,825	219,279	252,841

* FT – Farelo de trigo; FFM- Farinha de fundo de moinho; FC – Farinha de cola; FV – Farinha de varredura.

** Fator de conversão = 5,83 (Jones, 1931; IAL, 2005).

*** Calculada com base no teor de amido.

Os teores de umidade das amostras são bastante similares e estão dentro do esperado para farinhas e derivados de cereais. Para a farinha de trigo o teor máximo de umidade aceito é de 15% (TACO, 2011; BRASIL, 2005).

Os teores de cinzas, proteínas e amido estão expressos em percentual de matéria seca. O teor de cinzas é tido como um indicativo do rendimento de extração e padrão de qualidade de farinhas de trigo (BRASIL, 2005), uma vez que as partes externas do grão (aleurona e farelo) possuem maiores teores de cinzas do que o endosperma. Como esperado, o FT apresentou maiores teores de cinzas (5,02%), seguido pela FFM (2,68%).

Quanto aos teores de proteínas, a FFM apresentou os maiores resultados (18,02%), seguida pelo FT (15,8%), FC (15,18%), e por fim a FV (14,57%). Os resultados obtidos podem ser mais uma vez justificados pela fração do grão da qual cada amostra é composta. O maior teor de proteínas do grão está no endosperma, principalmente em suas partes mais externas, conhecidas como subaleurona, e na camada de aleurona (MIRANDA, 2006; POMERANZ, 1988). Uma vez que a FFM é composta principalmente das camadas externas do endosperma, justifica-se o maior teor de proteínas encontrado. Os resultados obtidos para o teor de proteínas da FFM e FT se encontram próximos à faixa reportada por Hemdane et al. (2015) e da

composição fornecida pela *Nutrient Database for Standard* do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), que correspondem a 18,8% e entre 15,55-18,9% para farinhas de cauda e farelo de trigo, respectivamente.

A composição centesimal e perfil de minerais da farinha de cola (FC) e farinha de varredura (FV) são bastante similares e podem ser comparados com a composição da farinha de trigo comum (composição fornecida na Tabela 6), uma vez que ambas são farinha fora do padrão de qualidade, que não podem ser aproveitadas para o consumo humano, e por isso são consideradas resíduos. O teor de proteínas destas amostras é de cerca de 15%, um pouco acima do reportado na Tabela 6, que está entre 9,8 e 10,33 (USDA, 2018; TACO, 2011). A legislação brasileira estabelece apenas o teor mínimo de proteínas para farinha de trigo, de 8% (BRASIL, 2005).

Vale ressaltar que a composição da farinha e dos subprodutos pode variar de acordo com a variedade do trigo e sistema de moagem, o que justifica algumas diferenças entre resultados obtidos (Tabela 12) e os dados reportados na literatura (Tabela 6). O maior teor de amido presente no FT e na FFM e menor teor de cinzas no FT em relação aos dados reportados por Hemdane et al. (2015) podem ser indício de uma maior quantidade do endosperma amiláceo presente nestas frações consideradas resíduo. Analogamente, o maior teor de cinzas e proteínas na FC e FV pode ser um indício da presença das camadas externas do grão nestas farinhas.

Tal fato também pode justificar as diferenças entre perfil de minerais obtido aqui e o apresentado na Tabela 6. Para todos os minerais, os resultados para a FC e FV são superiores aos reportados para farinha de trigo, enquanto que a quantidade de fósforo, magnésio e potássio presentes no farelo de trigo são inferiores aos reportados na *Nutrient Database for Standard*. Dados sobre a composição de minerais de farinhas de cauda não foram reportados na literatura. No entanto, a camada de aleurona possui cerca de 60% da quantidade de minerais presentes no grão, apesar de se tratar de uma camada bem pequena deste (DELCOUR & HOSENEY, 2010), o que pode justificar os maiores resultados para alguns minerais, como fósforo, magnésio e potássio.

Uma vez que os principais indutores da produção de amilases reportados são o amido, fontes de nitrogênio e minerais, os teores de lipídeos e de fibras das amostras não foram quantificados. No entanto, para amostras como a farinha de trigo estas frações são pequenas, em torno de 1 a 3% para ambos (USDA, 2018; TACO, 2011). Para o farelo, o teor de lipídeos aproximado é de 4% e o de fibras pode chegar até 42,8% (USDA, 2018).

Foi possível observar que a composição de cada subproduto varia de acordo com a fração do grão da qual é formada. Uma vez que os fatores avaliados são indutores da produção

de amilases microbianas, os resultados obtidos são importantes para entender o efeito da utilização de cada subproduto na produção de amilases de *C. comatus*.

4.2 SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE AMILASES

A produção de amilases nos meios alternativos contendo 10 g.L⁻¹ dos resíduos estudados foi avaliada ao longo de 7 dias de cultivo. Os maiores valores e atividade enzimática foram encontrados em 72, 96 e 120h de cultivo (Tabela 13).

Para todos os meios formulados com os subprodutos do trigo, a máxima atividade enzimática para α -amilase e glucoamilase foi atingida em 120h de cultivo. A partir deste tempo, foi observada queda nas atividades enzimáticas. Verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre as atividades de α -amilase obtidas para os meios formulados com os resíduos. As maiores atividades enzimáticas para esta enzima foram obtidas em meio contendo a farinha de cauda ou farinha de fundo de moinho (FFM), correspondente a $6,07 \pm 0,03$ U.mL⁻¹ (α -amilase) e $0,64 \pm 0,03$ U.mL⁻¹ (glucoamilase).

TABELA 13 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA, MÁXIMA ATIVIDADE E PRODUTIVIDADE DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE PELA CEPA *C. comatus* EM 72, 96 E 120H DE CULTIVO EM MEIOS CONTENDO 10 g.L⁻¹ DOS DIFERENTES RESÍDUOS TESTADOS (FT, FFM, FC e FV) A 28 °C E 120 RPM.

Meio de Cultivo / Tempo (h)	α -amilase			Glucoamilase		
	Atividade (U.mL ⁻¹)	Máxima atividade (U.mL ⁻¹)	Produtividade (U.mL.h ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹)	Máxima atividade (U.mL ⁻¹)	Produtividade (U.mL.h ⁻¹)
FT	72h	3,69 \pm 0,07	0,05	0,29 \pm 0,21		0,004
	96h	4,41 \pm 0,16	0,05	0,51 \pm 0,10	0,56 \pm 0,08 ^a	0,005
	120h	5,06 \pm 0,14	0,04	0,56 \pm 0,08		0,005
FFM	72h	4,48 \pm 0,92	0,06	0,26 \pm 0,02		0,004
	96h	5,90 \pm 0,06	0,05	0,46 \pm 0,02	0,64 \pm 0,03^a	0,005
	120h	6,07 \pm 0,03	0,05	0,64 \pm 0,03	0,03^a	0,005
FC	72h	4,52 \pm 0,24	0,06	0,20 \pm 0,01		0,003
	96h	4,72 \pm 0,26	0,05	0,37 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01 ^{ab}	0,004
	120h	4,97 \pm 0,07	0,04	0,46 \pm 0,01		0,004
FV	72h	4,39 \pm 0,23	0,06	0,24 \pm 0,02		0,003
	96h	4,84 \pm 0,88	0,05	0,37 \pm 0,08	0,40 \pm 0,13 ^{ab}	0,004
	120h	4,88 \pm 0,06	0,04	0,40 \pm 0,13		0,003

Valores representam a média dos experimentos \pm desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam valores médios com diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$) e letras iguais representam valores médios sem diferença significativa ($p > 0,05$).

A diferença entre os resultados de atividade enzimática obtidos pode ser explicada pela composição centesimal e pelo perfil de alguns minerais (Tabela 12) dos subprodutos utilizados.

Os resultados superiores obtidos com a utilização da FFM e do FT podem ser justificados pelos maiores teores de cinzas e de proteínas encontrados nestes resíduos.

A FFM possui o maior teor de proteínas e maiores quantidades de minerais importantes para o crescimento microbiano e produção de enzimas, como o fósforo (760 mg/100g), magnésio (272,259 mg/100g) e potássio (816 mg/100g) (Tabela 12), além de apresentar um equilibrado teor de amido (aprox. 64%). É, portanto, uma boa fonte de carbono, de minerais e melhor fonte de nitrogênio quando comparada aos demais resíduos, que justificam os resultados superiores obtidos em meio de cultivo contendo este subproduto.

Em meio contendo o farelo de trigo moído (FT), as atividades de α -amilase e glucoamilase obtidas foram de $5,06 \pm 0,14 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,56 \pm 0,08 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Este resíduo apresenta elevado teor de cinzas, mas o perfil de minerais é diferente do apresentado na farinha de fundo de moinho (Tabela 12). Tal fato, além do menor teor de amido, importante indutor para produção de amilases, podem justificar os resultados menores de atividade enzimática com relação à FFM.

O FT e a FFM apresentaram as menores relações C/N, calculadas de acordo com o teor de amido, dentre as amostras estudadas (8,27:1 e 10,72:1). A relação C/N ideal para produção de amilases de microrganismos não está esclarecida na literatura, mas pode-se observar que maiores atividades enzimáticas de *C. comatus* foram encontradas em meio contendo menores razões C/N. Estudos reportam que a relação C/N ideal para produção de biomassa de *Agaricus brasiliensis* é de 11:1 (ZAGHI JUNIOR et al., 2010). Para produção de α -amilase de *C. comatus* em meio de cultivo sintético, Paludo (2018) encontrou melhores resultados em meio com relação C/N de 13,5:1.

O perfil de produção de amilases de *C. comatus* nos meios formulados com a farinha de cola e farinha de varredura (Tabela 13), assim como a composição e perfil de minerais destes resíduos (Tabela 12), são bastante similares. Não foram encontrados estudos que reportem a utilização de subprodutos deste tipo ou mesmo de farinha de trigo comum para produção de amilases de fonte microbiana. A FC geralmente é produto de devoluções, por estar fora do padrão de qualidade ou da validade, que é encaminhada para produção de cola utilizada pela indústria madeireira. A FV é o produto que atinge o chão durante processamento (ver Figura 5, subitem 3.1). Portanto, não há uma estimativa de quantidades produzidas destes resíduos e sua disponibilidade, o que dificultaria projeções caso haja interesse em utilizá-los para produção de enzimas.

O farelo, as farinhas de cauda e o gérmen são os subprodutos de maior representatividade produzidos durante o processamento do trigo. O farelo de trigo já foi

utilizado em estudos para produção de amilases de macromicetos conduzidos por EL-ZALAKI e HAMZA (1979), KEKOS et al., (1987) e ZILLY et al. (2012). No primeiro estudo, a produção de α -amilase por uma cepa de *Lentinus edodes* foi de 400 U.mL⁻¹ em extrato de farelo de trigo, após 7 dias de cultivo, apesar de não ter sido o melhor meio de cultivo para produção da enzima. No segundo, a produção de amilases pela espécie *Calvatia gigantea*, medida pela liberação de açúcares redutores, atingiu a 60,4 U.mL⁻¹, em condições otimizadas. No estudo realizado por Zilly et al. (2012) o farelo de trigo foi o melhor substrato para produção de amilases por diversas cepas de macromicetos em cultivo sólido, mas as atividades amilolíticas não ultrapassaram 0,009 U.mL⁻¹.

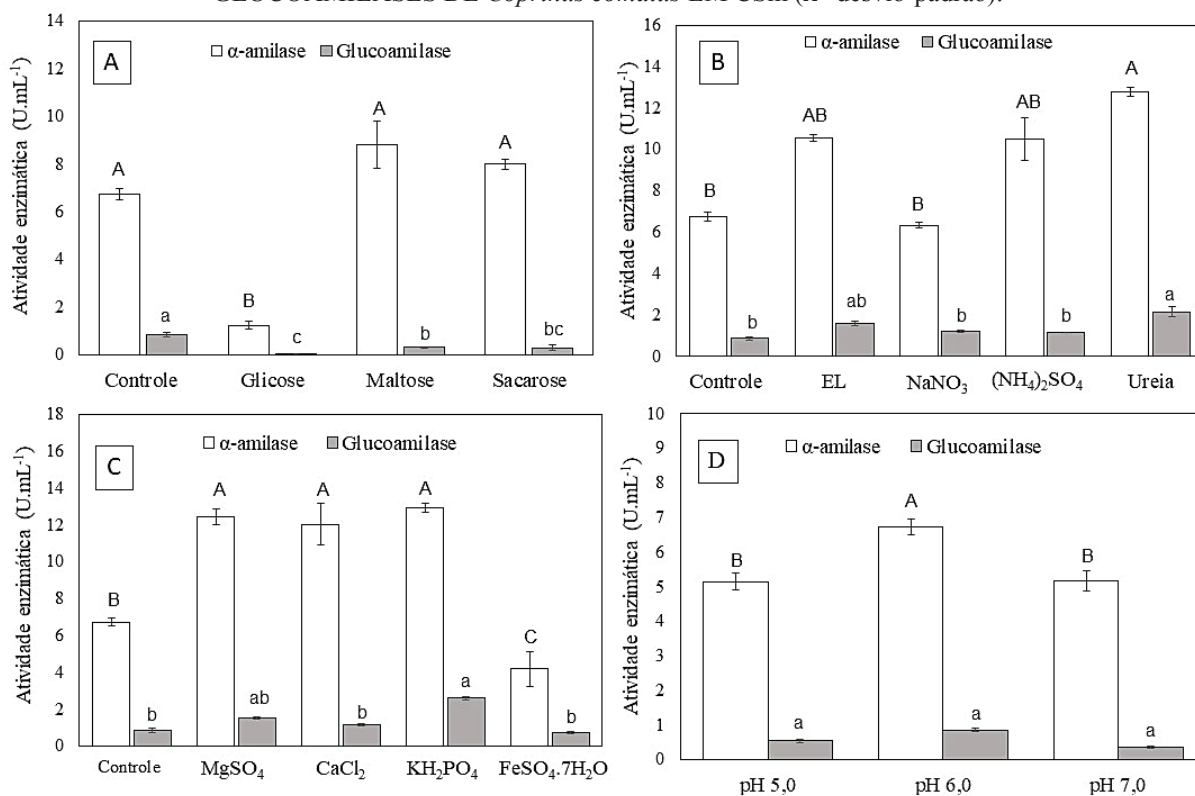
Farinhas de baixo grau de purificação foram utilizadas em bioprocessos para produção de etanol por Neves et al. (2006a, 2006b) e para produção de hidrogênio por processo fermentativo por Hawkes et al. (2008), mas existem poucos estudos relacionados à produção de amilases utilizando estes tipos de farinha, especialmente por fungos do grupo dos macromicetos. Dentre os poucos relatos encontrados, Kammoun et al. (2008) e Naili et al. (2016) utilizaram um subproduto de moagem do trigo com composição semelhante à farinha de fundo de moinho utilizada no presente estudo (60% amido, 5% de outros carboidratos e 13,65% de proteína) para produção de amilases por cultivo submerso de fungos do gênero *Aspergillus*. Kammoun et al. (2008), utilizando uma concentração de 2,5% do substrato e suplementação com peptona, extrato de levedura, NaCl, KH₂PO₄, MgSO₄ e CaCl₂, obtiveram atividade de α -amilase de 21,81 U.mL⁻¹, a 25°C e 150 rpm. Os resultados são superiores aos encontrados no presente estudo, mas ressalta-se que foram obtidos com maiores concentrações de substratos e presença de outros componentes no meio de cultivo.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que todos os subprodutos de trigo avaliados são capazes de induzir a produção de amilases por *C. comatus*. No entanto, levando em consideração os resultados de atividade enzimática, a facilidade de manipulação do resíduo e formulação dos meios de cultivo, além da inexistência de outros estudos que tenham empregado este tipo de material na produção de amilases por fungos do grupo dos macromicetos, a farinha de fundo de moinho (FFM) foi selecionada para as etapas posteriores de otimização da produção de amilases.

4.3 TESTES PRELIMINARES DE SUPLEMENTAÇÃO E AJUSTE DE pH INICIAL DO MEIO DE CULTIVO

Apesar da produção de amilases em meio contendo somente a FFM ter se mostrado promissora, os resultados obtidos foram menores que o esperado quando comparados linhagens de macromicetos utilizadas em outros estudos (EL-ZALAKI e HAMZA, 1979; KEKOS et al., 1987). Desta forma, decidiu-se avaliar o efeito da adição de fontes de carbono, nitrogênio e sais ao meio contendo uma quantidade fixa de FFM, pelo método OVAT. Os resultados obtidos para os testes de suplementação, e para diferentes pHs iniciais do meio de cultivo estão apresentados na Figura 6.

FIGURA 6 - EFEITO DA ADIÇÃO DE FONTES DE CARBONO (A), FONTES DE NITROGÊNIO (B), DE SAIS (C) E DO pH INICIAL DO MEIO DE CULTIVO (D) NA PRODUÇÃO DE α -AMILASES E GLUCOAMILASES DE *Coprinus comatus* EM CSm ($\bar{X} \pm$ desvio-padrão).



FONTE: A autora (2018)

Condições de cultivo: 28°C, 120 rpm. Meio controle: 10 g.L⁻¹ de FFM

*Letras iguais nas colunas representam valores de atividade enzimática relativa sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$) e letras diferentes representam valores com diferença significativa ($p \leq 0,05$).

**Letras maiúsculas indicam teste de médias para atividade relativa de α -amilase e letras minúsculas para glucoamilase

O efeito de fontes de carbono adicionais em meios de cultivo formulados a partir de resíduos é comumente avaliado em diversos estudos para produção de enzimas (SINGH;

KAPOOR; KUMAR, 2011; SINGH; GUPTA, 2014; IMEN; MAHMOUD, 2015; DUTTA et al., 2016). A presença de açúcares mais facilmente assimiláveis do que polissacarídeos, como o amido, pode auxiliar na adaptação e crescimento do microrganismo, e desencadear um aumento na produção de enzima. Por outro lado, estes açúcares podem agir como repressores na produção da enzima em estudo. Em geral, reporta-se que a produção de amilases é induzida por carboidratos contendo ligações glicosídicas α -1,4, como maltose, maltodextrinas ou amido (CARLSEN; NIELSEN, 2001).

Pelos resultados apresentados na Figura 6 observa-se que a presença de glicose no meio de cultivo teve efeito repressor na produção de α -amilases e glucoamilases por *Coprinus comatus*, efeito similar ao reportado por Naili et al. (2016) no cultivo de *Aspergillus* sp. e contrário ao estudo realizado por Hasan et al. (2017), em que a glicose foi a melhor fonte de carbono para produção de amilases extracelulares por espécies bacterianas *Chryseobacterium* sp e *Bacillus* sp. A adição de maltose e sacarose ao meio apresentou efeitos contrários na produção de α -amilase e glucoamilase, sendo estas fontes de carbono indutoras para produção da primeira enzima e repressoras para a segunda. Tendo em vista o efeito negativo na produção de glucoamilases, a adição de fontes de carbono não foi considerada para etapas posteriores.

As atividades de α -amilase em meios suplementados com de extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ureia foram de 10,54 U.mL⁻¹, 10,48 U.mL⁻¹ e 12,76 U.mL⁻¹, respectivamente 56%, 55% e 89% superiores à atividade obtida no meio controle (6,74 U.mL⁻¹). A produção de glucoamilases no meio de cultivo com adição de ureia também foi superior aos demais meios, correspondendo a 2,15 U.mL⁻¹. Nos meios suplementados com extrato de levedura, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as atividades enzimáticas obtidas foram de 1,59 U.mL⁻¹, 1,21 U.mL⁻¹ e 1,17 U.mL⁻¹, respectivamente.

Embora fontes orgânicas e complexas de nitrogênio, como o extrato de levedura, sejam reportadas como melhores indutoras do crescimento e produção de amilases para diversas espécies fúngicas e bacterianas (GUPTA et al., 2003), pelos resultados obtidos observa-se que a ureia foi a melhor fonte de nitrogênio indutora para produção de amilases de *C. comatus*. Tais resultados corroboram com estudo realizado por Jonathan e Adeoyo (2011), cujos melhores resultados de produção de amilases para espécies como *Pleurotus tuber-regium*, *Agaricus* sp, *Agaricus blazei* e *Coriopsis occidentalis* foram obtidos em meio suplementado com ureia. Vale ressaltar que a FFM também é uma fonte de nitrogênio e a associação de pelo menos duas fontes de nitrogênio demonstrou melhores resultados em estudo realizado por Kammoun et al. (2008). A possibilidade de utilização da ureia como fonte de nitrogênio na produção de amilases de microrganismos é um aspecto positivo, uma vez que esta fonte apresenta menores custos do que

fontes como o extrato de levedura, por exemplo. Pelos resultados na produção de amilases e por apresentar menores custos, a ureia foi escolhida como fonte de nitrogênio suplementar para etapas posteriores do estudo.

Dentre as fontes minerais testadas, a adição de K_2HPO_4 , $MgSO_4$ e $CaCl_2$ resultou em atividades enzimáticas de α -amilase 92%, 85% e 72% superiores ao controle, respectivamente. A produção de glucoamilases foi estimulada em maiores proporções pela adição K_2HPO_4 (cerca de 200%) e de $MgSO_4$ (cerca de 78%). Estes resultados corroboram com resultados reportados em diversos estudos, em que a adição de K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 e de sais de Mg^{2+} tem demonstrado efeito significativo na otimização das condições de cultivo para produção de amilases (KAMMOUN et al., 2008). Este efeito tem sido atribuído ao efeito tamponante da adição de fosfato no meio de cultivo e o seu papel regulatório na expressão de metabólitos primários e secundários, além da importância de íons PO_4^{2-} e Mg^{2+} na constituição celular (RAMESH; MURTY, 2014). Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+}/Fe^{3+} também são importantes co-fatores de diversas enzimas, como as amilases (DUTTA et al, 2016). A presença de Ca^{+2} como co-fator tem sido reportada como essencial para a atividade da α -amilase (SUNDARRAM; MURTHY, 2014), o que pode justificar o efeito positivo da adição do sal $CaCl_2$ no meio de cultivo para atividade de α -amilase, já que a adição do mesmo não possui efeito significativo na produção de glucoamilases. A adição de $FeSO_4$ foi avaliada devido ao efeito positivo apresentado na formulação de meios de cultivo em estudos anteriores, mas apresentou efeito repressor no meio formulado com a FFM (redução de 38% na atividade de α -amilase e 16% na atividade de glucoamilase).

Na Figura 6 (D) estão apresentadas as atividades de α -amilase e glucoamilase obtidas em meios com pH inicial de 5,0; 6,0 (controle) e 7,0. A atividade de α -amilase foi superior em meio de cultivo com pH inicial de 6,0, enquanto que a atividade de glucoamilase não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nos diferentes pHs testados. Levando em consideração os resultados superiores obtidos para α -amilase em pH 6,0, os demais experimentos, portanto, foram conduzidos neste pH inicial.

Diante dos resultados obtidos pela adição de suplementação à FFM, um planejamento fatorial fracionado foi conduzido para avaliar o efeito da variação da concentração deste substrato, de ureia, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ e $CaCl_2$ na produção de α -amilases e glucoamilases por *Coprinus comatus*.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO

A matriz dos ensaios realizados com os valores codificados das variáveis estudadas e das respostas obtidas para α -amilases e glucoamilases está apresentada na Tabela 14.

TABELA 14 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{5-1} UTILIZADO PARA AVALIAR OS EFEITOS DOS COMPONENTES (X1= FFM; X2= Ureia; X3= K_2HPO_4 ; X4= $MgSO_4$ E X5= $CaCl_2$) DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE AMILASES DE *Coprinus comatus* EM CSm, pH 6,0, TEMPERATURA 28°C E 120 RPM

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	α -amilase*	Glucoamilase*
1	-1	-1	-1	-1	1	10,43 \pm 0,45	1,68 \pm 0,01
2	1	-1	-1	-1	-1	14,05 \pm 0,71	3,78 \pm 0,02
3	-1	1	-1	-1	-1	1,05 \pm 0,06	1,00 \pm 0,01
4	1	1	-1	-1	1	20,07 \pm 0,51	4,64 \pm 0,01
5	-1	-1	1	-1	-1	6,45 \pm 0,57	0,08 \pm 0,01
6	1	-1	1	-1	1	15,79 \pm 0,13	4,72 \pm 0,03
7	-1	1	1	-1	1	26,60 \pm 1,10	2,14 \pm 0,01
8	1	1	1	-1	-1	37,85\pm0,63	5,76\pm0,04
9	-1	-1	-1	1	-1	11,66 \pm 0,18	1,97 \pm 0,03
10	1	-1	-1	1	1	15,73 \pm 0,24	2,91 \pm 0,04
11	-1	1	-1	1	1	0,76\pm0,20	0,88\pm0,01
12	1	1	-1	1	-1	20,72 \pm 0,79	3,98 \pm 0,05
13	-1	-1	1	1	1	16,04 \pm 1,78	1,98 \pm 0,003
14	1	-1	1	1	-1	20,46 \pm 0,43	3,61 \pm 0,06
15	-1	1	1	1	-1	25,84 \pm 0,35	2,84 \pm 0,003
16	1	1	1	1	1	33,65 \pm 1,13	3,72 \pm 0,05
17	0	0	0	0	0	11,86 \pm 0,41	3,14 \pm 0,02
18	0	0	0	0	0	13,44 \pm 0,12	3,35 \pm 0,01
19	0	0	0	0	0	12,63 \pm 0,11	2,95 \pm 0,2

*Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Média de três determinações de atividade enzimática (U.mL⁻¹).

Para α -amilase, a maior resposta obtida no planejamento foi 37,85 U.mL⁻¹ (ensaio 8), em que as concentrações de $MgSO_4$ e $CaCl_2$ se encontravam em seu nível mínimo (-1) e as demais variáveis no nível +1. Por outro lado, a menor resposta foi de 0,76 U.mL⁻¹ (ensaio 11), em que a FFM e o K_2HPO_4 se encontravam em seu nível -1. As atividades de glucoamilase variaram entre 0,08 U.mL⁻¹ (ensaio 5) e 5,76 U.mL⁻¹ (ensaio 8). A partir dos resultados obtidos, foram calculados os efeitos de cada uma das variáveis nas atividades de α -amilase e glucoamilase, apresentados na Tabela 15.

Pelos resultados apresentados na Tabela 15, verificou-se que a concentração de substrato, ureia e K_2HPO_4 apresentou efeitos significativos ($p \leq 0,05$) e positivos em ambas as respostas avaliadas (atividades de α -amilase e glucoamilase). Quanto maiores as concentrações

destes componentes, dentro do intervalo estudado, maiores as respostas obtidas. O efeito das concentrações de MgSO_4 e CaCl_2 não foi significativo para nenhuma das respostas. Para α -amilase estes efeitos são positivos, o que indica que quanto maiores as concentrações MgSO_4 e CaCl_2 , maior a atividade desta enzima. Isto ocorre de forma oposta para glucoamilases, cujos efeitos das concentrações de MgSO_4 e CaCl_2 são negativos.

TABELA 15 - EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FRACIONADO 2⁵⁻¹ SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE (U.mL^{-1}). X1= FFM; X2= Ureia; X3= K_2HPO_4 ; X4= MgSO_4 E X5= CaCl_2 .

Fatores	α -amilase				Glucoamilase			
	Efeito ^a	Erro padrão	t (3)	p – valor	Efeito ^a	Erro padrão	t (3)	p – valor
Média	16,58468	0,996984	16,63485	0,000473*	2,900086	0,071241	40,70814	0,000033*
X1	9,93837	2,172877	4,57383	0,019612*	2,568443	0,155266	16,54221	0,000481*
X2	6,98984	2,172877	3,21686	0,048701*	0,530583	0,155266	3,41725	0,041927*
X3	11,02678	2,172877	5,07474	0,014778*	0,501578	0,155266	3,23044	0,048200*
X4	1,57226	2,172877	0,72358	0,521639	-0,239238	0,155266	-1,54082	0,221010
X5	0,12337	2,172877	0,05678	0,958294	-0,044284	0,155266	-0,28522	0,794037

^a Efeitos expressos em U.mL^{-1} ; * $p \leq 0,05$

Dentre os diversos fatores limitantes no crescimento e regulação metabólica microbiana, as fontes de carbono e de nitrogênio são consideradas as mais importantes. O fosfato também possui função regulatória importante, e está presente em cadeias de transporte específicas para diversos micro-organismos (HARDER; DIJKHUIZEN, 1983; GUPTA et al, 2003; RAMESH; MURTY, 2014). Tal fato justifica os efeitos significativos e positivos obtidos para estas variáveis no planejamento fracionado.

Ainda que a presença de magnésio seja importante no crescimento e produção de metabólitos microbianos e a presença de cálcio seja reportada como significativa para produção de amilases, a quantidade destes minerais presente naturalmente no substrato (Tabela 12), pode ter suprido as necessidades no cultivo quando variadas as suas concentrações, o que justifica os efeitos não significativos.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionado permitiram constatar quais variáveis seriam realmente relevantes e excluir componentes desnecessários para a próxima etapa de otimização. A partir dos efeitos avaliados, decidiu-se otimizar as concentrações de FFM, ureia e K_2HPO_4 utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR).

4.5 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

A matriz dos ensaios realizados no DCCR, contendo os níveis estudados e os valores observados para atividade de α -amilase e glucoamilase está apresentada na Tabela 16.

As atividades de α -amilase variaram entre 10,57 e 55,48 U.mL⁻¹ nos ensaios 9 e 12, respectivamente. Para glucoamilase, a menor atividade foi observada também no ensaio 9 (3,81 U.mL⁻¹), e a maior atividade no ensaio 7 (12,80 U.mL⁻¹).

TABELA 16 - DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA AVALIAR OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (FFM, UREIA E K₂HPO₄) NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE DE *Coprinus comatus* EM CSm, EM pH 6,0, TEMPERATURA 28°C, 120 RPM.

Ensaio	FFM	Ureia	K ₂ HPO ₄	α -amilase*	Glucoamilase*
1	-1,00	-1,00	-1,00	22,09±0,1	7,06±0,21
2	-1,00	-1,00	1,00	21,65±0,00	7,68±0,15
3	-1,00	1,00	-1,00	49,01±0,05	8,64±0,49
4	-1,00	1,00	1,00	54,78±0,79	11,36±0,17
5	1,00	-1,00	-1,00	35,88±0,20	7,15±0,44
6	1,00	-1,00	1,00	45,26±0,40	9,80±0,34
7	1,00	1,00	-1,00	50,55±0,15	12,80±0,65
8	1,00	1,00	1,00	54,26±0,05	11,42±0,36
9	-1,68	0,00	0,00	10,57±0,35	3,81±0,07
10	1,68	0,00	0,00	43,58±0,79	8,72±0,67
11	0,00	-1,68	0,00	16,60±0,84	7,87±0,20
12	0,00	1,68	0,00	55,48±0,39	10,95±0,21
13	0,00	0,00	-1,68	34,73±0,05	5,89±0,35
14	0,00	0,00	1,68	54,54±0,15	12,47±0,45
15*	0,00	0,00	0,00	52,23±0,29	12,71±0,67
16*	0,00	0,00	0,00	54,57±0,20	12,35±0,41
17*	0,00	0,00	0,00	46,52±0,54	11,18±0,43

*Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Média de três determinações de atividade enzimática (U.mL⁻¹).

Os maiores resultados de atividade enzimática (em negrito na Tabela 16) foram obtidos nos ensaios nos quais pelo menos uma das variáveis se encontrava no nível 0, +1 e + 1.68. A partir da análise dos efeitos, verificou-se que a produção de α -amilase foi influenciada majoritariamente pela concentração de FFM e ureia, cujos termos lineares exerceram efeitos significativos e positivos ($p=0,007$ e $p=0,0005$, respectivamente). Por outro lado, o termo quadrático (X_1^2) da variável FFM ($p=0,010$) exerceu efeito significativo negativo.

A produção de glucoamilase foi significativamente influenciada pelas três variáveis estudadas. Os termos lineares das variáveis ureia e K_2HPO_4 apresentaram efeitos significativos e positivos ($p=0,029$ e $p=0,047$). Por outro lado, o termo quadrático da FFM apresentou efeito negativo ($p=0,013$). O termo linear da FFM apresenta valor de $p=0,058$.

TABELA 17 – EFEITO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (X_1 =FFM, X_2 =UREIA E X_3 = K_2HPO_4) SOBRE AS RESPOSTAS (ATIVIDADES DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE).

Fator	α -amilase				Glucoamilase			
	Coefficiente de Regressão	Erro-padrão	Valor de t	Valor de p	Coefficiente de Regressão	Erro-padrão	Valor de t	Valor de p
Constante	50,67660	2,385498	21,24361	0,002209*	11,98727	1,014538	11,81550	0,000007*
FFM (X_1)	6,87790	1,120250	6,13961	0,025518*	1,07539	0,476436	2,25716	0,058577
FFM (X_1^2)	-7,01041	1,232999	-5,68566	0,029569*	-1,73849	0,524387	-3,31529	0,012848*
Ureia (X_2)	10,91712	1,120250	9,74525	0,010366*	1,29505	0,476436	2,71820	0,029843*
Ureia (X_2^2)	-3,84158	1,232999	-3,11564	0,089415	-0,62505	0,524387	-1,19196	0,272114
K_2HPO_4 (X_3)	3,78814	1,120250	3,38151	0,077433	1,14632	0,476436	2,40603	0,047048*
K_2HPO_4 (X_3^2)	-0,80390	1,232999	-0,65199	0,581326	-0,70769	0,524387	-1,34956	0,219172
X_1X_2	-4,54820	1,463677	-3,10738	0,089829	0,25012	0,622493	0,40181	0,699810
X_1X_3	0,96972	1,463677	0,66252	0,575771	-0,25833	0,622493	-0,41499	0,690575
X_2X_3	0,06854	1,463677	0,04682	0,966908	-0,24142	0,622493	-0,38782	0,709671

* Efeitos significativos ($p \leq 0,05$)

Tendo em vista a influência descrita das variáveis na produção de amilases e que a exclusão de algum dos termos poderia comprometer a habilidade do modelo em descrever o comportamento do processo, a análise de variância (ANOVA) foi conduzida considerando-se todos os termos (lineares e quadráticos). Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO OBTIDO PELO DCCR PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE.

Fonte de variação	α -amilase				Glucoamilase			
	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F
Regressão	3271,877	9	363,542	8,964	92,741	9	10,304	3,799
Resíduos	324,445	8	40,556		21,7	8	2,712	
Lack of Fit	290,167	5	58,033	3,386	20,412	5	4,082	6,337
Erro puro	34,278	2	17,139		1,288	2	0,644	
Total	3596,322	16			114,441	16		
	$R^2 = 0,9097$; $F_{0,05; 9,8} = 3,39$; $F_{tab; 5; 2} = 19,30$				$R^2 = 0,8104$; $F_{0,05; 9,8} = 3,39$; $F_{5; 2} = 19,30$			

^aSQ: soma dos quadrados; ^bGL: graus de liberdade; ^cMQ: média dos quadrados

Os valores de R^2 obtidos pela ANOVA indicam que 90,97% e 81,04% da variação na produção de α -amilase e glucoamilase, respectivamente, podem ser explicados pelos modelos obtidos. Segundo Kaur e Satyanarayana (2005), os valores de R^2 variam entre 0 e 1, e a obtenção de valores acima de 0,75 indicam aptidão do modelo.

Além disso, o F calculado para ambos os modelos foi significativo ($F_{cal} > F_{tab}$) e o valor de F obtido pela falta de ajuste (3,386 para α -amilase e 6,337 para glucoamilase) não se apresentou significativo ($F_{tab; 5; 2} = 19,30$), confirmando que os dados experimentais se ajustam de maneira satisfatória aos modelos. Sendo assim, uma equação foi obtida para cada modelo utilizando-se a técnica de regressão polinomial multivariada (Equações 9 e 10):

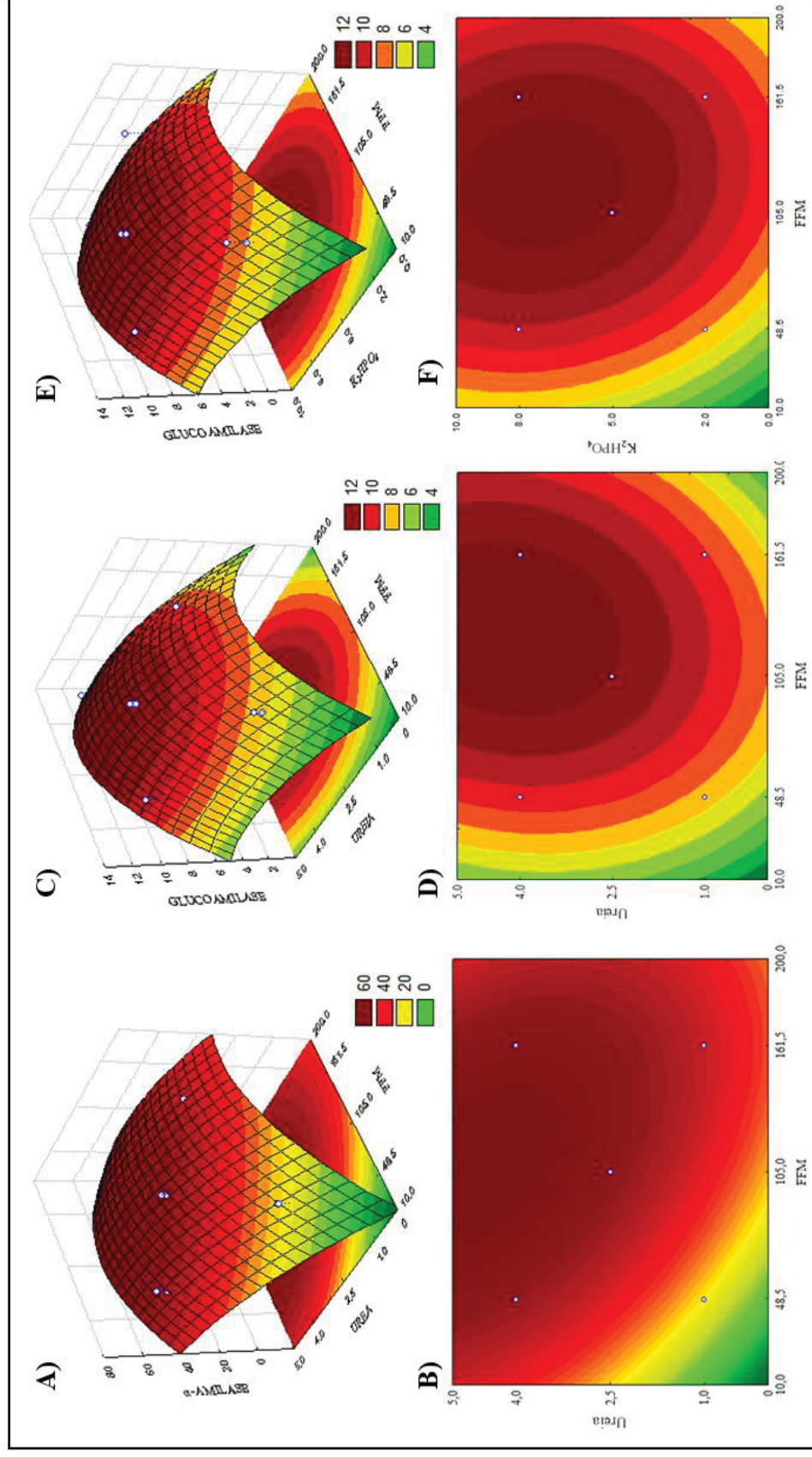
$$Y_1 = 50,6766 + 6,878X_1 - 7,01041X_1^2 + 10,917X_2 - 3,841X_2^2 + 3,788X_3 - 0,804X_3^2 - 4,548X_1X_2 + 0,969X_1X_3 + 0,068X_2X_3 \quad (11)$$

$$Y_2 = 11,987 + 1,075X_1 - 1,738X_1^2 + 1,295X_2 - 0,625X_2^2 + 1,146X_3 - 0,708X_3^2 + 0,250X_1X_2 - 0,258X_1X_3 - 0,241X_2X_3 \quad (12)$$

As equações do modelo obtidas foram empregadas na construção dos gráficos de superfície de resposta e suas respectivas curvas de contorno (Figura 7). Estas expressões gráficas são utilizadas para interpretar as interações entre duas variáveis, e encontrar o ponto ótimo para cada uma delas (JHAMPLE et al., 2015; GAJDHANE et al., 2016). Para α -amilase, a superfície de resposta foi obtida pela interação entre concentração de FFM e ureia, que apresentaram efeitos significativos, mantendo-se a concentração de K_2HPO_4 (não significativo) em seu ponto central. Para glucoamilase foram geradas superfícies de resposta pela interação entre FFM e ureia / FFM e K_2HPO_4 , mantendo-se a terceira variável em seu ponto central.

Com base nas superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas foi possível verificar que os valores ótimos para maximizar a produção de α -amilase, considerando apenas as variáveis significativas, foram: 119,8 g.L⁻¹ de FFM e 4,4 g.L⁻¹ de ureia. Para glucoamilase, as condições ótimas encontradas foram: 124,7 g.L⁻¹ de FFM, 4 g.L⁻¹ de ureia e 6,8 g.L⁻¹ de K₂HPO₄. Ensaios foram conduzidos nestas condições, para validar os modelos obtidos. Para α -amilase, o resultado obtido foi de $62,95 \pm 0,23$ U.mL⁻¹ e para glucoamilase o resultado obtido foi de $12,87 \pm 0,08$ U.mL⁻¹. Estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa dos resultados previstos pelo modelo (63,46 U.mL⁻¹ e 13,13 U.mL⁻¹, respectivamente) pelo teste de Tukey a 95% de significância.

FIGURA 7 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (A, C e E) E CURVAS DE CONTO (B, D e F) MOSTRANDO: (A) E (B) INTERAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE FFM E UREIA NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE; (C) E (D) INTERAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE FFM E UREIA NA PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASE; (E) E (F) CONCENTRAÇÃO DE FFM E K_2HPO_4 NA PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASES DE *Coprinus comatus* EM CSm.



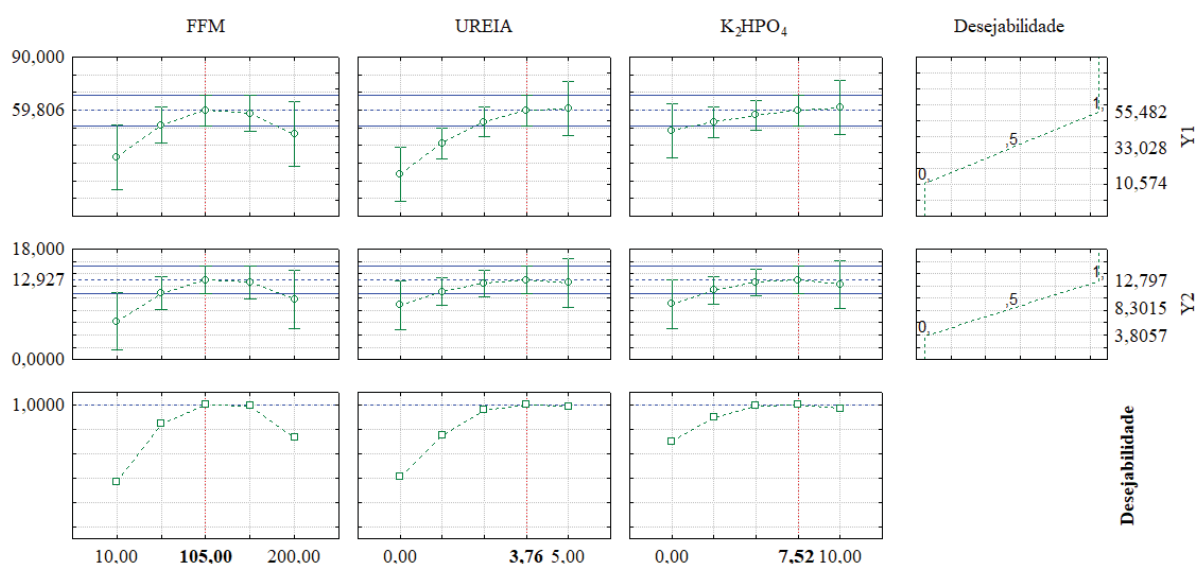
FONTE: A autora (2018)

Condições de cultivo: pH 6,0, 28°C e 120 rpm.

As condições ótimas para maximizar a produção de α -amilase e glucoamilase de *C. comatus* de forma conjunta foram obtidos pelo perfil de desejabilidade (Figura 8).

Os valores correspondentes aos pontos ótimos apresentados na imagem são: 105 g.L⁻¹ de FFM, 3,76 g.L⁻¹ de ureia e 7,52 g.L⁻¹ de K₂HPO₄. Nestas condições, os valores preditos para α -amilase e glucoamilase foram, respectivamente, 59,806 U.mL⁻¹ e 12,927 U.mL⁻¹. Os valores observados após condução de experimentos nestas condições foram 59,4±0,56 U.mL⁻¹ e 12,65±0,09 U.mL⁻¹. Estes valores também não diferem estatisticamente dos valores previstos a 95% de significância pelo teste de Tukey, o que indica novamente que o modelo obtido é eficaz para prever as atividades de α -amilase e glucoamilase.

FIGURA 8- PERFIS DE DESEJABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASES (Y1) E GLUCOAMILASES (Y2) (U.mL⁻¹) E NÍVEIS DE DESEJABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO DE FFM, UREIA E K₂HPO₄ PARA OTIMIZAÇÃO CONJUNTA DAS DUAS RESPOSTAS.



Fonte: A autora (2018)

Considerando as atividades enzimáticas obtidas nos ensaios iniciais de seleção do substrato e após otimização simultânea das duas respostas, obteve-se um aumento de 9,78 vezes na atividade enzimática de α -amilase e de 19,77 vezes na atividade enzimática de glucoamilase, o que comprova a eficiência das diversas etapas na otimização da produção destas enzimas pela espécie *C. comatus*. O meio ótimo obtido pelo perfil de desejabilidade foi utilizado nas etapas posteriores de estudo cinético do bioprocessamento e caracterização parcial das enzimas.

4.6 CINÉTICA FINAL DO BIOPROCESSO OTIMIZADO

A cinética final de crescimento e produção de α -amilase e glucoamilase no meio otimizado foi realizada ao longo de 240h (10 dias), e os resultados obtidos são apresentados na Figura 9.

Pode-se identificar as fases lag, log e estacionária do crescimento da espécie *C. comatus* e da produção de amilases. A fase lag (período de adaptação) ocorreu nas primeiras 36h de cultivo. Entre 36 e 120h de cultivo observa-se o crescimento logarítmico. A biomassa nesta fase variou entre 0,67 e 3,04 g.L⁻¹, chegando a 3,63 g.L⁻¹ em 240h.

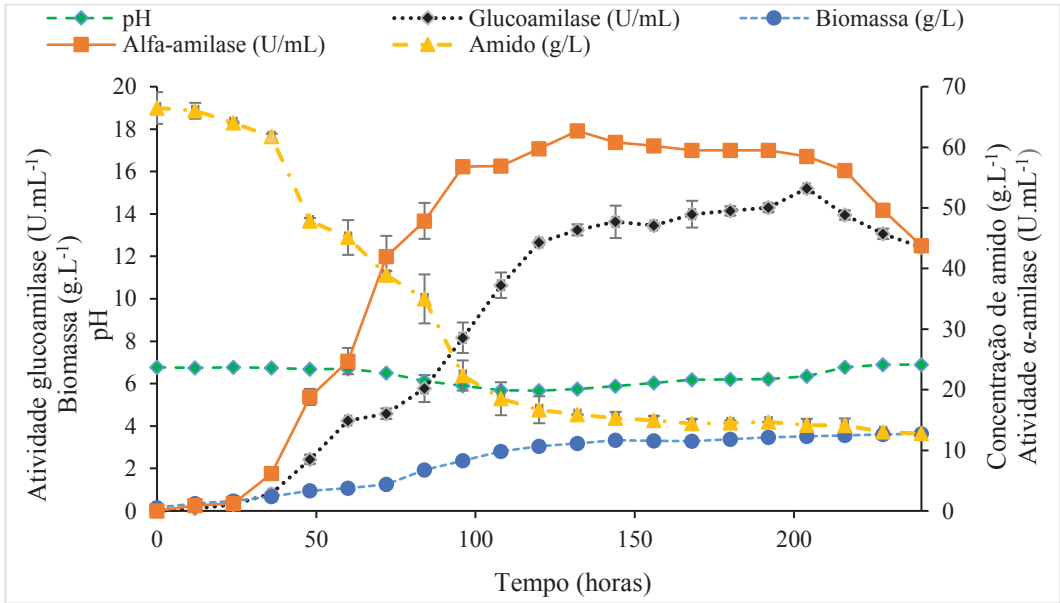
Observou-se comportamento similar na produção enzimática. O maior acréscimo na atividade enzimática de α -amilase ocorreu entre 36 e 96h de cultivo (6,18 – 56,81 U.mL⁻¹). Posteriormente houve aumento gradual, atingindo valores de 59,78 U.mL⁻¹ em 120h de cultivo. Da mesma forma, a produção de glucoamilases apresentou maior acréscimo neste período, variando de 0,81 a 12,65 U.mL⁻¹ entre 36 e 120h de cultivo.

Verificou-se estabilidade na atividade enzimática entre 120 e 216h de cultivo, a qual pode ser decorrente da alta concentração de substrato utilizada no meio de cultivo otimizado (quantificada na cinética em termos de amido). Verifica-se que em 120h o amido remanescente é reduzido a cerca 16 g.L⁻¹, que a partir de então decresce sutilmente, atingindo a concentração final de 12,76 g.L⁻¹.

A atividade de glucoamilase teve acréscimo após 120h de cultivo, e apresenta um pico (15,21 U.mL⁻¹) em 204h. Isto sugere um mecanismo associado de atuação das duas enzimas ao longo do cultivo. Estudos reportam que a produção de glucoamilase pode ser estimulada pelos produtos da hidrólise do amido liberados pela α -amilase (BARTON; GEORGI; LINEBACK, 1972; CARLSEN; NIELSEN, 2001; RAJOKA; YASMEEN, 2005). Os resultados obtidos sugerem que durante o cultivo existe uma hidrólise das cadeias de amido pela ação inicial da α -amilase. Em seguida a glucoamilase age hidrolisando maltose e dextrinas a glicose, o que justifica o pico tardio de atividade enzimática obtido para esta enzima.

O pH inicial do meio de cultivo (6,77) decresce sutilmente, apresentando menor valor em 120h (pH=5,67) e aumento ao final do cultivo (pH=6,9). A baixa alteração do pH pode ser atribuída à presença do K₂HPO₄, que atua como tamponante quando adicionado ao meio de cultivo (KAMMOUN et al., 2008; RAMESH; MURTY, 2014).

FIGURA 9 - RESULTADOS DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE (U.mL⁻¹), PRODUÇÃO DE BIOMASSA (g.L⁻¹), CONSUMO DE SUBSTRATO (g.L⁻¹) E pH AO LONGO DE 240h DE CULTIVO DE *C. comatus* EM CSm, UTILIZANDO MEIO FFM OTIMIZADO.



FONTE: A autora (2018)
Condições de cultivo: temperatura 28°C; agitação: 120 rpm

4.7 PARÂMETROS CINÉTICOS E FATORES DE CONVERSÃO

Pelos resultados obtidos na cinética, foi possível calcular os parâmetros do bioprocessamento de produção de amilases, apresentados na Tabela 19. Os resultados obtidos foram comparados com resultados de estudos anteriores (PALUDO et al., 2018), que otimizou meio de cultivo sintético para produção de α -amilases e glucoamilases separadamente.

TABELA 19 - PARÂMETROS CINÉTICOS DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE AMILASES DE *C. comatus* EM MEIO SINTÉTICO (PALUDO et al., 2018) E MEIO FFM OTIMIZADO NO PRESENTE ESTUDO.

Parâmetro	Meios sintéticos otimizados Paludo et al. (2018)		Meio FFM otimizado (presente estudo)	
	α -amilase	Glucoamilase	α -amilase	Glucoamilase
Biomassa (g.L ⁻¹)	0,77	0,65	3,78	
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,03	0,03	0,018	
Td (h)	22,13	25,24	38,61	
Máxima atividade (U.mL ⁻¹)	5.84 (48h)	8.87 (44h)	62,7 (136h)	15,20 (204h)
$\gamma_{pm\acute{a}x}$ (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0.12 (48h)	0,20 (44h)	0,59	0,11
γ_{xtotal} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,01	0,008		0,01
γ_{ptotal} (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,05	0,03	0,18	0,05
$Y_{P/S}$ (U.gds ⁻¹) ^a	323,01	192,61	814,28	231,24
$Y_{X/S}$ (gx.gds ⁻¹)	0,06	0,05		0,06
$Y_{P/X}$ (U.gdb ⁻¹) ^b	5260,02	3755,92	12542,34	3561,78

^agds = g de substrato; ^bgdb = g de biomassa

Pelos resultados apresentados na Tabela 19, observa-se que a produção de biomassa da espécie *C. comatus* em meio de cultivo sintético (à base de amido, ureia, FeSO_4 e K_2HPO_4) é inferior à produção em meio otimizado contendo FFM, ureia e K_2HPO_4 (0,77, 0,65 e 3,78 g.L⁻¹). Estudos reportam que o crescimento desta espécie é menor em meios que não contenham fontes complexas de nutrientes (como o extrato de levedura, por exemplo) (EDDY et. al. 1958; ADEBAYO-TAYO; UGWU, 2011). Neste caso, a FFM atua, além de principal fonte de carbono, como uma fonte de nitrogênio e diversos minerais, como descrito anteriormente, o que justifica a maior produção de biomassa. Ainda assim, a produção de biomassa de *C. comatus* no meio FFM é menor quando comparada a outras espécies de microrganismos cultivadas em CSM, como *Ganoderma lucidum* (cerca de 30 g.L⁻¹) (SALMON, et al. 2016). No meio FFM, a cepa apresenta menor taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,018 \text{ h}^{-1}$) e maior tempo de duplicação (38,61h) do que nos meios sintéticos.

Uma vez que o perfil de produção das enzimas parece estar associado ao perfil de crescimento da espécie, a menor produção de biomassa de *C. comatus* em meio sintético pode ter influenciado a produção de amilases neste meio. As máximas atividades enzimáticas são inferiores às encontradas no meio FFM (5,84 e 8,87 U.mL⁻¹ em meio sintético e 62,7 e 15,20 U.mL⁻¹ em meio FFM). A produtividade de α -amilase é de $\gamma_{\text{pmáx}} = 0,12 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em meio sintético e $0,59 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em meio FFM. No entanto, pelo curto período de tempo necessário para atingir a máxima atividade de glucoamilase, a produtividade horária máxima é superior em meio sintético ($0,20 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ contra $0,11 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Em termos de produtividade, o meio sintético seria mais apropriado para produção de glucoamilase. No entanto, a análise de outros parâmetros indica o contrário. Os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{\text{P/S}}$) foram maiores para ambas enzimas no meio (FFM) ($814,28 \text{ U.gds}^{-1}$ para α -amilase e $231,24 \text{ U.gds}^{-1}$ para glucoamilase, o que significa que para cada grama de substrato consumido são produzidas 814 U de α -amilase e 231 U de glucoamilase). Isto indica que há uma maior eficiência na conversão do substrato (amido) em enzima quando utiliza-se o FFM. Em um bioprocesso este fator pode significar redução de custos e, em conjunto com os parâmetros de produtividade, é importante na escolha dos microrganismos utilizados, dos meios de cultivo e de parâmetros de operação. Considerando ainda que a FFM possui menores custos de obtenção, conclui-se que o meio FFM é mais apropriado para produção de α -amilases e glucoamilases de *C. comatus* quando comparado ao meio sintético utilizado em estudos anteriores.

4.8 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

A realização de uma purificação de baixa resolução possibilita a exclusão de componentes do meio de cultivo que podem interferir nas etapas posteriores de caracterização, mas não possibilita separar a fração correspondente à α -amilase e glucoamilase presente no cultivo. Os ensaios, portanto, foram conduzidos com uma mesma amostra, e as atividades enzimáticas quantificadas pelas duas metodologias (subitens 3.7.1 e 3.7.2).

Após as etapas de *salting-out*, dessalinização e concentração em membranas de ultrafiltração, verificou-se que houve uma recuperação de cerca de 70% das enzimas em ambos os métodos de quantificação de atividade enzimática (Tabela 20). As perdas em processos de recuperação como este são comuns. Spier et al. (2015) observaram perdas semelhantes (31,3%) utilizando as mesmas etapas para purificação de fitases produzidas por *Ganoderma australe*.

A quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) e cálculo da atividade específica (expressa em U por mg de proteína) comprova uma purificação das enzimas. Pela dosagem de α -amilase, a atividade específica anterior à concentração é de 378,90 U.mg⁻¹ e de 557,97 U.mg⁻¹ após o procedimento. Para glucoamilases as atividades específicas foram 82,47 e 111,73 U.mg⁻¹ antes e após purificação, respectivamente.

TABELA 20 - EFICIÊNCIA DA ETAPA DE ULTRAFILTRAÇÃO PARA DESSALINIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE UTILIZANDO FILTROS DE 10 KDa (VIVASPIN 6, GE®, REINO UNIDO).

α -amilase	Atividade (U.mL ⁻¹)	Volume (mL)	Atividade total	Atividade Relativa (%)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Perda (%)	Concentração (vezes)
Antes	60,66	1,084	65,75	100,00	378,90	-	-
Após (Retentado)	189,17	0,25	47,29	71,93	557,97	28,07	3,12
Glucoamilase							
Antes	13,20	1,084	14,31	100,00	82,47	-	-
Após (Retentado)	37,88	0,25	9,47	66,18	111,73	33,82	2,87

*A fração de permeado não apresentou atividade de α -amilase ou glucoamilase.

4.9 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS AMILASES

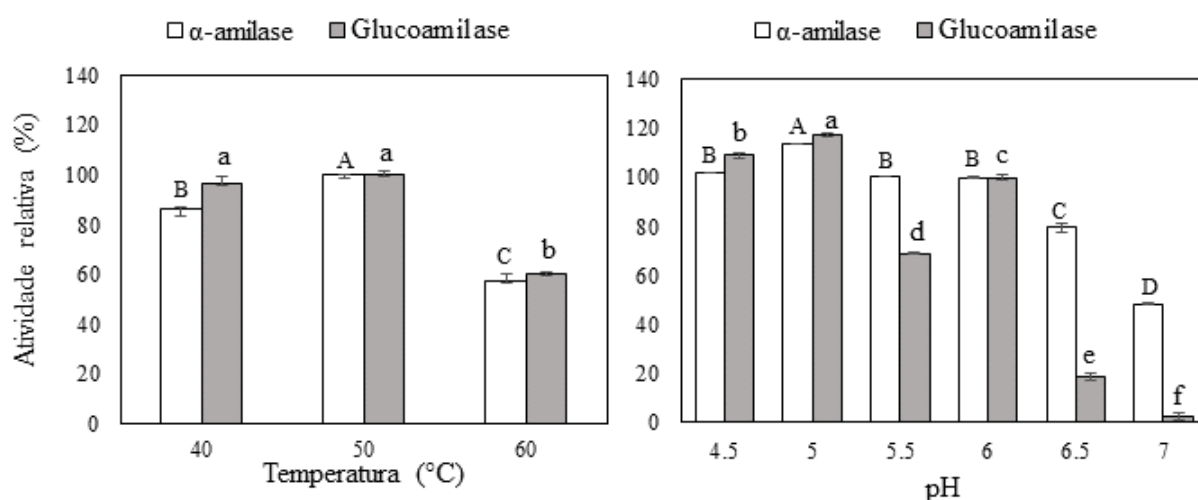
A influência do pH e temperatura de reação enzimática nos extratos parcialmente purificados pode ser visualizada na Figura 10.

A temperatura e pH ótimos de atuação de uma enzima dependem da sua fonte de origem. A α -amilase obtida de *Bacillus laterosporus*, por exemplo, possui atuação ótima em

60°C e pH 7. Amilases provenientes de macromicetos, como *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsuaga*, e *Hericium erinaceum* apresentaram pHs de atuação de 5,5, 4,5 e 6 e temperaturas ótimas de 50, 35 e 40°C, respectivamente (DO; KIM, 1985; IRSHAD et al. 2012; DU et al., 2013).

As amilases produzidas por *C. comatus* apresentaram atuação ótima em 50°C e pH 5,0. Este perfil é semelhante ao reportado por Do e Kim (1985) para glucoamilases produzidas por *Ganoderma lucidum*, e é comum para amilases provenientes diversas espécies fúngicas como *Aspergillus oryzae* (DEY; BANERJEE, 2015). A caracterização do extrato bruto obtido do cultivo em meio sintético de *C. comatus* apresentou a mesma temperatura ótima de atuação para ambas as enzimas (PALUDO et al., 2018), mas o pH ótimo observado foi 6,0 e 6,5 para α -amilase e glucoamilase, respectivamente. Esta diferença pode estar relacionada à interferência de algum componente do meio de cultivo, ou mesmo com o tampão utilizado (tampão acetato, 0,5M).

FIGURA 10 - INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA DE REAÇÃO NAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE PRODUZIDAS POR *C. comatus* ($\bar{X} \pm \text{DESVIO-PADRÃO}$).



FONTE: A autora (2018)

*Letras iguais nas colunas representam valores de atividade enzimática relativa sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$) e letras diferentes representam valores com diferença significativa ($p \leq 0,05$).

**Letras maiúsculas indicam teste de médias para atividade relativa de α -amilase e letras minúsculas para glucoamilase.

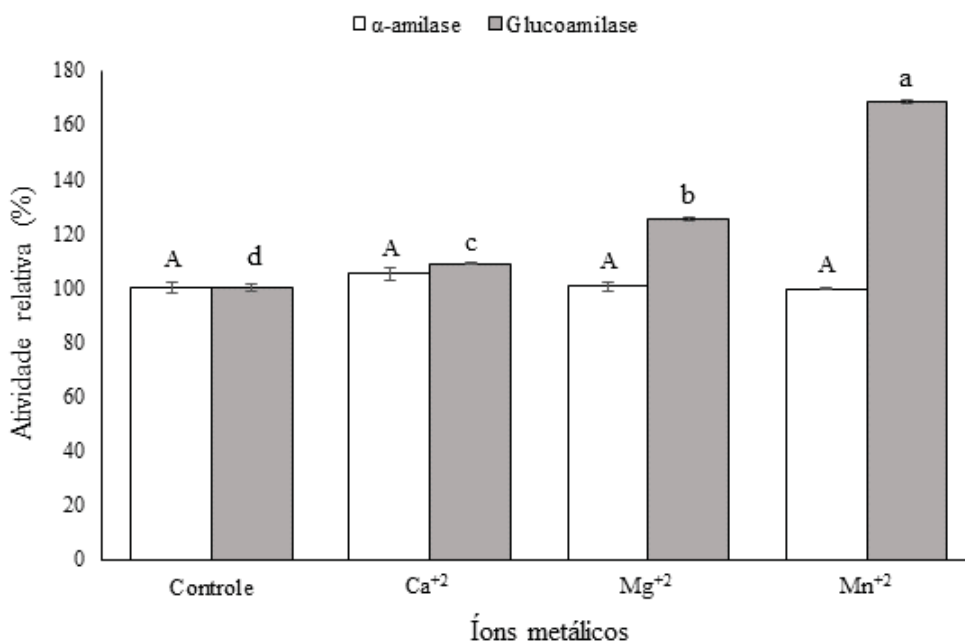
A influência da presença dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} na atividade relativa de α -amilase e glucoamilase pode ser observada na Figura 11.

É bem estabelecido que a presença de diversos íons metálicos pode facilitar a interação entre o sítio catalítico da enzima e seu respectivo substrato (PASIN et al. 2017). Diversos estudos reportam que a α -amilase é uma metaloenzima que contém o Ca^{2+} como grupo

prostético, e que a presença deste íon é importante para sua atividade e estabilidade (GUPTA et al, 2003; SOUZA; MAGALHÃES, 2010). No presente estudo, a adição dos íons não se mostrou significativa na atividade de α -amilase, o que indica que a mesma é uma enzima independente do cálcio. Este tipo de α -amilase é importante no processo de produção de xarope de frutose, uma vez que a glicose isomerase utilizada no processo pode ser inibida pela presença deste íon (TONKOVA, 2006; SINGH et al, 2012; MOUNA IMEN; MAHMOUD, 2015).

Para glucoamilase, os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} exerceram efeito positivo na atividade enzimática, aumentando em 9%, 25% e 68% a atividade da enzima, respectivamente. O manganês, principal ativador desta enzima, também foi reportado como importante ativador de outras glucoamilases produzidas por espécies fúngicas, como *Aspergillus phoenicis* (BENASSI et al. 2014), *Aspergillus japonicus* (PASIN et al. 2017) *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae* (ALMEIDA et al., 2017).

FIGURA 11 – INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE ÍONS Ca^{2+} , Mg^{2+} E Mn^{2+} NA ATIVIDADE DE α -AMILASES E GLUCOAMILASES PRODUZIDAS POR *C. comatus*.



FONTE: A autora (2018)

*Letras iguais nas colunas representam valores de atividade enzimática relativa sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$) e letras diferentes representam valores com diferença significativa ($p \leq 0,05$).

**Letras maiúsculas indicam teste de médias para atividade relativa de α -amilase e letras minúsculas para glucoamilase

As características descritas para as amilases de *C. comatus*, como o perfil de temperatura e pH, e sua independência de cálcio, permitem sua aplicação em uma diversidade de processos importantes na indústria de alimentos, como na panificação e a já mencionada produção de xaropes de frutose. Portanto, o bioprocesso desenvolvido neste trabalho representa

avanços para obtenção de amilases de uma nova fonte microbiana. Maior detalhamento sobre as etapas de *downstream*, separação e caracterização das enzimas merecem atenção para trabalhos futuros.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo:

- Os subprodutos de moagem do trigo estudados apresentam composição química e perfil de minerais variada, que tem influência significativa no perfil de produção de enzimas com a sua utilização;
- A FFM foi o melhor substrato para produção de amilases da cepa *Coprinus comatus*, e os maiores resultados de atividade enzimática para α -amilases e glucoamilases em meio formulado com 10 g.L⁻¹ deste resíduo foram de 6,07 U.mL⁻¹ e 0,64 U.mL⁻¹;
- Após testes iniciais de suplementação, verificou-se que a adição de fontes de nitrogênio e de sais poderia influenciar na produção de enzimas em meio contendo 10 g.L⁻¹ de FFM;
- O planejamento fatorial fracionado selecionou três variáveis significativas na produção de amilases de *C. comatus*: concentração de FFM, de ureia e de K₂HPO₄;
- O meio de cultivo otimizado, após DCCR, é composto de 105 g.L⁻¹ de FFM, 3,761 g.L⁻¹ de ureia e 7,522 g.L⁻¹ de K₂HPO₄. A utilização deste meio permitiu atingir atividade enzimática em 120h de cultivo de 59,4±0,56 U.mL⁻¹ e 12,652±0,09 U.mL⁻¹ para α -amilase e glucoamilase, respectivamente, o que representa um aumento de 878% e 1877% da produção enzimática inicial;
- Na cinética final, os resultados de atividade enzimática atingiram valores ainda superiores, de 62,7 U.mL⁻¹ em 136h para α -amilase e 15,20 U.mL⁻¹ em 204h para glucoamilase;
- A utilização do meio formulado permite atingir alta produtividade e fatores de conversão e representa uma alternativa para redução de custos para produção de amilases;
- As amilases produzidas apresentaram pH e temperatura ótimos de atuação 5,0 e 50°C. A atividade de α -amilase não foi significativamente influenciada pela presença dos íons Ca²⁺, Mg²⁺ e Mn²⁺, enquanto que a atividade de glucoamilase aumentou em 9%, 25% e 68% na presença destes íons, respectivamente;
- Conclui-se que o trabalho representa avanços na obtenção de amilases de uma nova fonte microbiana, utilizando subprodutos de baixo custo.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos futuros podem ser realizados para avaliar a influência de parâmetros físico-químicos do processo, e para adaptar este processo para maiores escalas de produção em biorreatores. A etapa de *downstream* merece maior atenção, em que podem ser aprimoradas as etapas de recuperação, separação da fração de α -amilase e glucoamilase, formulação de produtos enzimáticos e, por fim, podem ser verificadas as possibilidades de aplicação das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS

- ADEBAYO-TAYO, B. C.; UGWU, E. E., Influence of Different Nutrient Sources on Exopolysaccharide Production and Biomass Yield by Submerged Culture of *Trametes versicolor* and *Coprinus sp.* **A.U. Journal of Technology**. V. 15, n. 2, p. 63-69. 2011.
- ADEJUWON, A. O.; OLAJIDE, O.; ADEWOLE, O. Production of amylase from *Aspergillus niger* using a defined synthetic growth medium and also rice (*Oryza sativa*) as growth substrate. , v. 1, n. 7, p. 91–94, 2012.
- ADRIO, J. L.; DEMAİN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- AHMED, S. A. et al. Improvement of bacterial α -amylase production and application using two steps statistical factorial design. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 10, p.224-233, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.004>.
- ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, 2017. DOI: 10.1590/1676-0611-bn-2017-0337
- AMFEP - ASSOCIATION OF MANUFACTURERS AND FORMULATORS OF ENZYME PRODUCTS. **List of enzymes**. 2015. Disponível em: <<http://www.amfep.org/content/list-enzymes>>. Acesso em: maio de 2018.
- AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Multiple Parameter Optimizations for Enhanced Biosynthesis of Exo-polygalacturonase Enzyme and its Application in Fruit Juice Clarification. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, n. 2, 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. 43 Washington, DC, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Washington, DC, 2005.
- BARTON, L. L, GEORGI, C. E., LINEBACK, D. R. Effect of Maltose on Glucoamylase Formation by *Aspergillus niger*. **Journal of bacteriology**, v. 111, n. 3, p. 771-777, 1972.
- BAŞ, D.; BOYACI, İ. H.; BAS, D.; et al. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836–845, 2007.
- BENASSI, V. M. et al. A novel glucoamylase activated by manganese and calcium produced in submerged fermentation by *Aspergillus phoenicis*. **Journal Of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 5, p.333-339, 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200515>.
- BON, E. P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95 – 104.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 2 de junho de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 105, p. 91, 3 jun. 2005. Seção 1.

- BUSWELL, J. A.; CHANG, S. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 12, p. 1317–1322, 1994.
- CARLSEN, M.; NIELSEN, J. Influence of carbon source on alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 346-349. 2001.
- CLÉMENT, H. et al. The effect of organic wheat flour by-products on sourdough performances assessed by a multi-criteria approach. **Food Research International**, [s.l.], v. 106, p.974-981, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.01.053.
- COLLA, E. **Seleção de leveduras produtoras de trealose e otimização da produção utilizando estratégias sequenciais de planejamento experimental**. (Tese de doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- DEB, P.; TALUKDAR, S. A.; MOHSINA, K.; SARKER, P. K.; SAYEM, S. A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 154, 2013.
- DÍAZ-GODÍNEZ, G.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; et al. Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 4186–4200, 2016.
- DO, J. H.; KIM, S. D. Properties of Amylase produced from Higher Fungi *Ganoderma Lucidum*. **Korean Journal Applied Microbiology and Bioengineering**, v. 13, p. 6, 1985.
- DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium Erinaceum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 23–27, 2013.
- DELCOUR, J. A.; HOSENEY, R. C.. **Principles of cereal science and technology**. 3^a ED. AACC International: St. Paul, MN, USA. 2010.
- DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.83-90, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.10.002>.
- DUTTA, P.; DEB, A.; MAJUMDAR, S. Optimization of the medium for the production of extracellular amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 isolated from municipal solid waste. **International Journal of Microbiology**, 2016. DOI: 10.1155/2016/4950743
- EDDY, B. P., Production of mushroom mycelium by submerged cultivation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 9, p. 644-649, 1958.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 2014.
- EL-ZALAKI, M. E.; HAMZA, M. A. Edible mushrooms as producers of amylases. **Food Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 203–211, 1979
- ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals Of Agrarian Science**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.273-277, 2017. DOI: 10.1016/j.aasci.2017.04.003.
- FREEDONIA GROUP. The Freedonia Group: **World Enzyme Demand to Reach \$7.2 Billion**. 2016. Disponível em: <<http://www.prnewswire.com/news-releases/the-freedonia-group-world-enzyme-demand-to-reach-72-billion-300290651.html>>. Acesso em: abril de 2017.

- FREITAS, F. O. Uso de Grãos de Amido na Identificação e Análise de Materiais Arqueológicos Vegetais. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. EMBRAPA. Brasília – DF. 2002.
- FUWA, H. A. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **The journal Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
- GAJDHANE, S. B.; BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B.. Statistical media optimization for enhanced production of α -galactosidase by a novel *Rhizopus oryzae* strain SUK. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 8, p.301-309, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.016>.
- GANGADHARAN, D. et al. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 11, p.4597-4602, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.07.028.
- GANGADHARAN, D; SIVARAMAKRISHNAN, S. Amylolytic enzymes. In: NIGAM, P.; PANDEY, A.. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, Springer Science: Netherlands, p. 359-370, 2009.
- GOUD, M.; SURYAM, A. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 354–360, 2009.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market Size Expected To Reach \$17.50 Billion By 2024**. 2016. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market>>. Acesso em: abril de 2017.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.
- HAN, J. R. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 61–66, 2003.
- HAN, J. R.; AN, C. H.; YUAN, J. M. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 910–915, 2005.
- HARDER, W.; DYKHUIZEN, L. Physiological responses to nutrient limitations. **Ann. Rev. Microbiol.** V. 37, p 1-23, 1983
- HAWKES, F. R. et al. Fermentative production of hydrogen from a wheat flour industry co-product. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 11, p.5020-5029, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.010.
- HEMDANE, S. et al. Wheat milling by-products and their impact on bread making. **Food Chemistry**, v. 187, p.280-289, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.048>.
- HSIEH, C.; TSENG, M. H.; LIU, C. J. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 109–117, 2006.
- HUERTA MORALES, E.; CRUZ CHILADO, M. M.; DÍAZ GODÍNEZ, G. Pectinase Activity of *Pleurotus ostreatus* Grown in Solid-State Fermentation. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 4, n. 5, 2014.
- IMEN, O. M.; MAHMOUD, K. Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces sp.* Grown on orange waste powder. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.4, pg. 685-693, 2015. DOI: 10.1016/j.bcab.2015.08.011

INÁCIO, F. D. et al. Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. **Advances In Microbiology**, [s.l.], v. 05, n. 01, p.1-8, 2015. DOI: 10.4236/aim.2015.51001.

IRSHAD, M. Purification and characterization of α -amylase from *Ganoderma tsuaga* growing in waste bread medium. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 33, p.8288-8204, 2012. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb11.3643>.

JHAMPLE, S. B.; BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B.. Statistical media optimization for enhanced production of fibrinolytic enzyme from newly isolated *Proteus penneri* SP-20. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.370-379, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.05.006>.

JIANG, Man; TEN, Zhen; DING, Shaojun. Decolorization of Synthetic Dyes by Crude and Purified Laccases from *Coprinus comatus* Grown Under Different Cultures: The Role of Major Isoenzyme in Dyes Decolorization. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p.660-672, 28 dez. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-0031-z>.

JONATHAN, S. G.; ADEOYO, O. R. Evaluation of tem wild Nigerian mushrooms for amylase and cellulase activities. **Mycobiology**, v. 39, n. 2, pg. 103-108, 2011. DOI: 10.4489/MYCO.2011.39.2.103

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, 2008.

KAUR, P.; SATYANARAYANA, T.. Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p.3095-3102, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.059>.

KEKOS, D.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MACRIS, B. J. Some nutritional factors affecting α -amylase production by *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 527–530, 1987.

KRUPODOROVA, T.; IVANOVA, T.; BARSHTEYN, V. Screening of Extracellular Enzymatic Activity of Macrofungi. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, p. 315–318, 2014.

KUMAR, N. M.; KARTHIKEYAN, S.; JAYARAMAN, G.. Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.38-44, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2012.10.005>.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365–78, 2013.

LI, B. et al. Antioxidant Properties of Cap and Stipe from *Coprinus comatus*. **Molecules**, v. 15, n. 3, p.1473-1486,. 2010. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15031473>.

LU, X; DING, S. Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p.68-74, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-009-0002-6>.

MA, K.; RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresource Technology**, v. 175, p.586-593, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.161>.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MIRANDA, M. Z. de; DE MORI, C.; LORINI, I. **Qualidade comercial do trigo brasileiro: safra 2007**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 49 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 126). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do126.htm>.

MIRANDA, M. Z. de. **Trigo**: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 12 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 74). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74.htm>.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701–724, 2007.

MOREIRA, K. A.; HERCULANO, P. N.; MACIEL, M. DE H. C.; et al. Optimization of phytase production by *Aspergillus japonicus* Saito URM 5633 using cassava bast as substrate in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 9, p. 929–938, 2014.

MORETTI, A. SAROCCO, S. Fungi. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRA, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Elsevier Ltd. Pág. 162-168, 2016.

NAILI, B.; SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; KAMMOUN, R. Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase production. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, pg. 185-192, 2016.

NEGI, S.; VIBHA, K.; Amylolytic Enzymes: glucoamylase. In: A. . PANDEY; S. . NEGI; C. R.. SOCCOL (Eds.); **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. 1st ed., p.25-46, 2017. Elsevier Ltd.

NEVES, M. A. et al. (a) Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 49, n. 3, p.481-490, 2006. DOI: 10.1590/s1516-89132006000400017.

NEVES, M. A. et al. (b) Wheat milling by-products fermentation: potential substrate for bioethanol production. **Life Science Journal**. V. 3. n. 2, p. 83-87, 2006.

PALUDO, L. C. **Otimização da produção de enzimas amilolíticas por macromicetos para aplicação na indústria de alimentos**. 86f. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

PALUDO, L. C. et al. Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 16, p.529-537, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.022>.

PANESAR, P. S. et al. Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p.208-227, 2016. DOI: 10.22037/afb.v3i4.13458.

PASIN, T. M. et al. Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 102, p.779-788, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.016>.

- PERALTA, R. M.; SILVA, B. P. DA; GOMES CÔRREA, R. C.; et al. **Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology**. 2017.
- PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/Staerke**, v. 62, n. 8, p. 389–420, 2010.
- POMERANZ, Y. **Wheat: Chemistry and Technology**. Vol. III. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, USA. 1988.
- PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 197–203, 2016.
- RAJOKA, M. I.; YASMEEN, A. Induction, and production studies of a novel glucoamylase of *Aspergillus niger*. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 21, n. 2, p.179-187, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-1766-7>.
- RAMESH, V.; MURTY, V. R. Sequential statistical optimization of media components for the production of glucoamylase by thermophilic fungus *Humicola grisea* MTCC 352. **Enzyme Research**, 2014. DOI: 10.1155/2014/317940
- RASHAD, M. M.; ABDOL, H. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U. Nutritional Analysis and Enzyme Activities of *Pleurotus Ostreatus* Cultivated on Citrus Limonium and Carica Papaya Wastes. **Enzyme**, v. 3, n. 4, p. 3352–3360, 2009.
- REYES, R.G. et al. *Coprinus comatus*, a newly domesticated wild nutraceutical mushroom in the Philippines. **Journal of Agricultural Technology**, v.5, n.2, p 299-316, 2009.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3ª. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014. 355.
- ROBINSON, D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Acribia S. A. 516 p. 1991.
- RUIZ, H. A. et al. Pectinolytic Enzymes. In: A. PANDEY; S. NEGI; C. R. SOCCOL (Eds.); **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. 1st ed., p.47–64, 2017. Elsevier Ltd.
- RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR, v. 78, n. 4, p. 614–49, 2014.
- SALES-CAMPOS, C.; VIANEZ, B. F.; ABREU, R. L. S. de. Productivity and nutritional composition of *Lentinus strigosus* (Svhwinitz) fries mushroom from the Amazon region cultivated in sawdust supplemented with soy bran. Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products, 2011.
- SANT'ANNA JUNIOR, G. L., Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, p 351-362.
- SAXENA, R. K. et al. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 260–265, 2007.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013.
- SILVA, T. M. Fungal Amylases: Application and Functional Properties. In: M. D. L. T. M. POLIZELI; M. RAI (Eds.); **Fungal Enzymes**. 1st ed., p.152–172, 2014.

SIMAIR, A. A. et al. Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. **Biomed Research International**, [s.l.], p.1-9, 2017. DOI: 10.1155/2017/9173040.

SINDHU, R. et al. Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 245, p.1740-1748, 2017. DOI:10.1016/j.biortech.2017.04.098.

SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Production of thermostable, Ca^{+2} -independent, maltose producing α -amylase by *Streptomyces* sp. MSC702 (MTCC 10772) in submerged fermentation using agro-residues as sole carbon source. **Annals Of Microbiology**, v. 62, n. 3, p.1003-1012, 2011. DOI:10.1007/s13213-011-0340-4.

SINGH, S., GUPTA, A. Comparative fermentation studies on amylase production by *Aspergillus flavus* TF-8 using Sal (*Shorea robusta*) deoiled cake as natural substrate: Characterization for potential application in detergency. **Industrial Crops And Products**, v. 57, p.158-165, 2014. DOI:10.1016/j.indcrop.2014.03.035.

SŁAWIŃSKA, A.; KALBARCZYK, J. Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. **Acta Sci Pol**, v. 10, n. 2, p. 195–202, 2011.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. e. Application of microbial α -amylase in industry - A review. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 4, p.850-861, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822010000400004>

SOUZA, H. Q. DE; OLIVEIRA, L. A. DE; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116–124, 2008.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidade por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 178p, 2005.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. D.; SOCCOL, C. R. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agro Industrials Products. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, n. 3, 2006.

SPIER, M. R.; BEHSNILIAN, D.; ZIELINSKI, A.; KONIETZNY, U.; GREINER, R. Studies Towards the Stabilisation of a Mushroom Phytase Produced by Submerged Cultivation. **Protein Journal**, v. 34, n. 5, p. 367–379, 2015.

STOJKOVIĆ, D. et al. Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 59, p.289-296, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.017>.

SUÁREZ-ARANGO, C.; NIETO, I. J. Biotechnological cultivation of edible macrofungi: An alternative for obtaining nutraceuticals. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 3, pg. 1-8, 2013. DOI: 10.1016/j.riam.2012.03.011

SUNDARRAM, A., MURTHY, T. P. K. α -Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v.2, n.4, pg. 166-175, 2014.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: UNICAMP/NEPA, 2011. 161 p. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: maio 2018.

- TATSUMI, E.; KONISHI, Y.; TSUJIYAMA, S. Application of residual polysaccharide-degrading enzymes in dried shiitake mushrooms as an enzyme preparation in food processing. **Biotechnol. Lett.**, 2016. DOI: DOI 10.1007/s10529-016-2176-2
- TIWARI, S.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, C.; et al. Amylases: An overview with Special Reference to Alpha Amylase. **Journal of Global Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 1886–1901, 2015.
- THOMAS, G. V. et al. Evaluation of lignocellulosic biomass from Coconut Palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) **Wastes J. Microbiol. Biotechnol.** 14: 879-882. 1998.
- TONKOVA A. Microbial starch converting enzymes of the α amylase family. In: Ray RC, Wards OP (eds) **Microbial biotechnology in horticulture**, vol I. Science, Enfield, pp 421–472. 2006.
- UDDIN, M. R.; FERDOUS, K.; RAHMAN, M. A.; ROY, A. K.; KHAN, M. R. Amylatic Activity of *Agaricus* and Moulds for the Production of Bioethanol. **Chemical Engineering and Science**, v. 1, n. 1, pg. 7-11, 2013. DOI: 10.12691/ces-1-1-2.
- UENO, S. et al. Secretory enzyme production and conidiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 1987;26:273/6.
- USDA – United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. 2018a. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>> Acesso em: maio 2018.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Nutrient Database for Standard Reference: Wheat Bran, Crude**. 2018b. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/305273?manu=&fgcd=&ds=&q=Wheat%20bran,%20crude>> Acesso em: maio de 2018.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Nutrient Database for Standard Reference: Wheat Flour, White, all purpose, unenriched**. 2018c. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/305354?manu=&fgcd=&ds=&q=Wheat%20flour,%20white,%20all-purpose,%20unenriched>> Acesso em: maio de 2018.
- VINOGRADOVA, S. P.; KUSHNIR, S. N. Biosynthesis of Hydrolytic Enzymes during Co-cultivation of Macro- and Micromycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, V. 39, N. 6, p. 573–575, 2003.
- VITOLO, M. Industrial Uses of Enzymes. In: DOELLE, H. W.; ROKEM, J. S.; BEROVIC M. **Biotechnology: Industrial Biotechnology** – Part II. Vol. VI. EOLSS publications. p. 135-138. 2009.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. **Analytical Biochemistry**, v. 351, pg. 146-148, 2006.
- WAN, J. et al. Characterization of the glycoside hydrolase family 15 glucoamylase gene from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. **Mycoscience**, v. 53, pg. 194-202, 2012. DOI: 10.1007/s10267-011-0153-0
- YOON, M. Y.; YOO, Y. J.; CADMAN, T. W.; Phosphate effects in the fermentation of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biotechnology Letters**, V. 2, n. 1, p 57-60, 1989.
- ZANOTTO, S. P; **Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos oticamente ativos**. Tese (pós-graduação em química). Centro de ciências físicas e matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2003.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920-1934, 2010.

ZHAO, S. et al. A Novel Laccase with Potent Antiproliferative and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Mycelia of Mushroom *Coprinus comatus*. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-8, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/417461>.

ZILLY, A et al. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. **Food And Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1573-1580, 2011. DOI: 10.1007/s11947-011-0532-8.